



HAL
open science

Interactome de la méthionine synthase et compartimentation de la synthèse de méthionine

Manon Jeandel

► **To cite this version:**

Manon Jeandel. Interactome de la méthionine synthase et compartimentation de la synthèse de méthionine. Sciences du Vivant [q-bio]. Université de Lorraine, 2024. Français. NNT : 2024LORR0135 . tel-04921094

HAL Id: tel-04921094

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-04921094v1>

Submitted on 30 Jan 2025

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

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



**UNIVERSITÉ
DE LORRAINE**

**BIBLIOTHÈQUES
UNIVERSITAIRES**

AVERTISSEMENT

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

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

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

Contact bibliothèque : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr
(Cette adresse ne permet pas de contacter les auteurs)

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

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

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



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 **Manon JEANDEL**

Sous la direction du Dr David COELHO et du Pr Jean-Louis GUEANT

Interactome de la méthionine synthase et compartimentation de la synthèse de méthionine

Le 27 novembre 2024

Membres du jury :

Rapporteurs :	Béatrice MORIO	DR INRAE – INSERM UMRS1060 – INRAE U1397 – Université de Lyon 1, Lyon, France
	Jean-François BENOIST	PU-PH Biochimie métabolique – AP-HP Hôpital Necker-Enfants malades, Paris, France
Examineurs :	Sylvie FOURNEL-GIGLEUX	DR INSERM UMRS7365 CNRS – Université de Lorraine, Nancy, France (Présidente du jury)
	Catherine-Laure TOMASETTO	DR INSERM UMRS7104 – IGBMC – Université de Strasbourg, Strasbourg, France
	David COELHO	CRCN INSERM UMRS1256 INSERM – Université de Lorraine, Nancy, France (Directeur de thèse)
	Jean-Louis GUEANT	PU-PH UMRS1256 INSERM – Université de Lorraine, Nancy, France (Co-directeur de thèse)
Membres invités :	Véronique REGNAULT	DR INSERM UMRS1116 INSERM – Université de Lorraine, Nancy, France
	Jean-Noël FREUND	DR INSERM UMRS1256 INSERM – Université de Lorraine, Nancy, France

Remerciements

Ce manuscrit signe pour moi la fin de ces trois années de thèse mais aussi ces presque quatre ans passés au laboratoire NGERE. Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont été présentes et qui m'ont soutenu durant mon parcours du combattant.

A **Monsieur David COELHO**, Chargé de recherche INSERM, **mon directeur de thèse**.

C'est toi que je tenais à remercier en premier. Merci de m'avoir permis de réaliser mon stage de 3^{ème} année de Licence à tes côtés. Ce stage m'a permis de découvrir la recherche et m'a motivée à poursuivre dans cette voie. Merci de m'avoir choisie pour le stage de Master 2 et par la suite merci de m'avoir soutenue et préparée au concours de l'école doctorale. Je pense que tous les mots de la Terre ne seraient pas suffisants pour t'exprimer ma gratitude. Tu as fait de moi la jeune chercheuse que je suis et je te dois tout le travail que j'ai réalisé. J'ai été chanceuse et extrêmement heureuse d'avoir appris à tes côtés à travers tes connaissances et ta passion de la recherche. Je te remercie beaucoup pour tout ce que tu as fait pour moi. MERCI.

A **Monsieur Jean-Louis GUEANT**, Professeur des Universités et Praticien Hospitalier, **mon co-directeur de thèse**.

Je tenais à vous remercier de m'avoir accueillie au sein du laboratoire NGERE durant ces 4 années aussi bien durant mes stages que pendant ma thèse. Je vous remercie également pour votre grande expertise scientifique.

A **Monsieur David MEYRE**, Professeur des Universités et Praticien Hospitalier, **directeur du laboratoire NGERE U1256**.

Je vous remercie grandement de m'avoir accueillie au sein du laboratoire. Je tenais aussi à vous remercier pour vos précieux conseils et vos relectures tout au long de ma thèse, votre bonne humeur communicative mais aussi votre soutien précieux dans les moments difficiles.

A **Madame Béatrice MORIO**, Directrice de recherche INRAE U1060 à Lyon et à **Monsieur Jean-François BENOIST**, Professeur des Universités et Praticien Hospitalier à Paris, **rapporteurs de ce travail**.

Je vous remercie de l'honneur que vous me faites en acceptant d'être rapporteurs de mon travail et pour votre participation au jury de thèse. Je vous témoigne toute ma reconnaissance et ma gratitude.

A **Madame Sylvie FOURNEL-GIGLEUX**, Directrice de recherche INSERM U7365 à Nancy et à **Madame Catherine-Laure TOMASETTO**, Directrice de recherche INSERM U7104 à Strasbourg, **examinatrices de ce travail**.

Je vous remercie Mesdames d'avoir accepté d'évaluer mon travail et de faire partie de mon jury de thèse. Je vous témoigne toute ma reconnaissance et ma gratitude.

A **Madame Véronique REGNAULT**, Directrice de recherche INSERM U1116 à Nancy et à **Monsieur Jean-Noël FREUND**, Directeur de recherche INSERM U1256 à Nancy, **mes membres de comité de suivi de thèse**.

Je vous remercie grandement d'avoir accepté de faire partie de mon comité de suivi de thèse ainsi que pour vos conseils et remarques précieuses durant nos discussions scientifiques qui ont fait grandement avancer mon travail de thèse.

A **Monsieur François FEILLET**, Professeur des Universités NGERE U1256, Praticien Hospitalier et Directeur du Centre de Référence des Maladies Héréditaires du Métabolisme au CHRU de Nancy.

Je vous remercie pour votre gentillesse et votre bienveillance. J'ai énormément apprécié travailler avec vous lors de la préparation du concours de l'école doctorale de Zeinab. Merci pour vos relectures attentives de mon travail.

A **Madame Natacha DREUMONT**, Professeur des Universités U1256.

Je te remercie pour ta présence, tes conseils ainsi que ton encadrement pendant de nombreuses manip. J'ai beaucoup appris à tes côtés, merci.

A **Monsieur Xavier MANIVAL**, Directeur de Recherche CNRS U7365 et à **Monsieur Benoit BRAGANTINI**, Ingénieur de Recherche CNRS U7365.

Je vous remercie grandement pour le travail que vous avez réalisé sur la caractérisation des interactions protéine-protéine. J'ai pris énormément de plaisir à collaborer avec vous dans ce nouveau projet basé sur mes résultats de thèse. Merci beaucoup pour votre enthousiasme et votre disponibilité pour travailler sur ce projet. J'espère que cela amènera de grandes choses.

A **Jean-Marc**, Ingénieur d'études et sauveur du labo.

Je tenais à t'exprimer ma profonde gratitude. Merci énormément pour ton aide, pour tous tes conseils durant ma thèse, pour ton soutien et pour ton partage de connaissances et compétences. Merci pour ta disponibilité et ta gentillesse. Tu m'as sauvé à de nombreuses reprises avec mes manip d'incorporation ^{14}C qui n'obéissent qu'à toi. Un immense merci à toi !

Mes remerciements les plus sincères à **Aurélie**, pour ses conseils et les magnifiques moments passés dans le bureau, à **Okan** pour son travail de titan en culture, l'expert du LC/MS-MS et pour sa bonne humeur toujours au rendez-vous, à **Céline**, pour tous ses conseils et ses remarques ainsi que pour sa gentillesse et son professionnalisme en culture et à **Justine P.**, pour son optimisme à toute épreuve et pour tous les passages de commande à mon nom (tu vas être heureuse que je finisse, moi ta plus fidèle cliente !).

A **Justine et Elise**, mes super nanas, ma DDE d'amour, mes folles à moi. Merci d'avoir été là, dans tous les moments qu'ils soient bons ou mauvais. Merci d'avoir toujours cru en moi et en mes capacités. Vous êtes les meilleures ! Que serait la thèse sans de vraies amies ? Je vous aime fort mes loulouttes !

A **Zeinab**, la meilleure des stagiaires ! Merci de m'avoir fait confiance et d'avoir toujours été là pour moi en cette fin de thèse. Tu m'as permis d'améliorer mon encadrement et je t'en remercie ! J'ai passé un super stage à tes côtés. Bon courage pour la thèse !

Un grand merci à tous **mes collègues du laboratoire NGERE** avec qui j'ai passé des super bons moments, qui ont toujours été là pour des conseils, des remarques ou encore un petit mot gentil. Merci pour tous nos moments de convivialité tous ensemble. Ce laboratoire était vraiment ma deuxième maison. Merci à tous !

A ma famille, oui un grand merci à toute ma famille, votre présence dans ma vie, votre patience et votre bonne humeur m'ont permis de surmonter et de tenir bon tout au long de cette thèse. **Papa, Maman** et ma petite sœur **Nanou**, merci d'avoir cru en moi, de m'avoir permis de faire ces études et d'avoir participé à la réalisation de mon rêve. Merci à ma belle-famille, **Bruno, Fabrina, Michel, Marina** et mon filleul **Hugo**. Merci de m'avoir soutenue et encouragée tout au long de ce long parcours.

Et enfin merci à la personne sans laquelle je ne serais pas là, à mon **Pitou**. Merci de m'avoir supportée, de m'avoir soutenue, de m'avoir encouragée durant toutes mes années d'études et encore plus durant cette thèse. Je ne suis vraiment pas la personne la plus facile à vivre et pour autant tu n'as jamais faibli et tu m'as toujours poussé à aller plus loin même quand je baissais les bras. Je n'y serais jamais arrivé sans toi, tu es l'étoile qui a guidé ma longue route et qui la guidera toute ma vie. Je t'aime grand.

Publications et communications

Publications

[Multiomic analysis in fibroblasts of patients with inborn errors of cobalamin metabolism reveals concordance with clinical and metabolic variability.](#)

eBioMedicine 2024;99: 104911 [10.1016/j.ebiom.2023.104911](https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2023.104911)

Arnaud Wiedemann, Abderrahim Oussalah, Rosa-Maria Guéant Rodriguez, Elise Jeannesson, Marc Mertens, Irina Rotaru, Jean-Marc Alberto, Okan Baspinar, Charif Rashka, Ziad Hassan, Youssef Siblini, Karim Matmat, **Manon Jeandel**, Celine Chery, Aurélie Robert, Guillaume Chevreux, Laurent Lignières, Jean-Michel Camadro, François Feillet, David Coelho, Jean-Louis Guéant.

[SIRT1 mediates the metabolic and neurodevelopmental consequences of methionine synthase deficiency in inborn errors of cobalamin metabolism.](#)

Karim Matmat, Ziad Hassan, Grégory Pourié, Sneha Seal, **Manon Jeandel**, Carole Arnold, Rémy Umoret, Ramia Safar, Almut Heinken, Jean-Marc Alberto, Okan Baspinar, Justine Paoli, Sébastien Hergalant, Pierre Rouyer, Jean-Michel Camadro, Laurent Lignières, David Coelho, Jean-Louis Guéant, Rosa-Maria Guéant-Rodriguez.

En soumission

[Methionine synthase deficiency leads to SIRT1-mediated global alterations of mitochondria.](#)

Ziad Hassan, Grégory Pourié, Karim Matmat, Benjamin Brustolin, **Manon Jeandel**, Christo Christov, Arnaud Wiedemann, Jeremy Willekens, Aurélie Robert, Jean-Louis Guéant, David Coelho.

En révision

[Methionine synthase interacts with MAT \$\alpha\$ 2 and DNMT3b in the nucleus: evidence of nuclear methionine cycle.](#)

Manon JEANDEL, Jean-Marc ALBERTO, Okan BASPINAR, Aurélie ROBERT, Natacha DREUMONT, Zeinab ALSAHLI, François FEILLET, David MEYRE, Jean-Louis GUEANT, David COELHO.

En soumission

Communications orales

Society for the Study of Inborn Errors in Metabolism (SSIEM) 2024 Annual Symposium Exploring New Horizons ; Porto ; Portugal ; Septembre 2024. **Prix de la meilleure présentation orale "Late Breaking News Honourable Mention"**.

Manon JEANDEL, Jean-Marc ALBERTO, Okan BASPINAR, Aurélie ROBERT, Natacha DREUMONT, Zeinab ALSAHLI, David MEYRE, Jean-Louis GUEANT, David COELHO.

Methionine synthase interacts with MAT α 2 and DNMT3b in the nucleus: evidence of nuclear methionine cycle.

14th International Conference One-Carbone Metabolism B Vitamins and Homocysteine and 2nd CluB-12 Annual Symposium ; Cambridge ; Royaume-Uni, Septembre 2023. **Prix de la meilleure présentation orale**.

Manon JEANDEL, Aurélie ROBERT, Jean-Louis GUEANT, David COELHO.

The nuclear location of methionine synthase and methionine synthase cycle open new clues in the links of the remethylation pathway with epigenetics.

Colloque annuel de la Société Cerveau et Maladies Cérébrovasculaires (SCMC), CAHPP premises ; Paris ; France, Juin 2023.

Manon JEANDEL, David COELHO, Ziad HASSAN, Rémy UMORET, Jean-Louis GUEANT, Grégory POURIE.

L'administration prénatale de SRT2104, un activateur pharmacologique de SIRT1 réduit les défauts cognitifs associés à une déficience en méthionine synthase chez la souris.

Journée de rentrée de l'école doctorale BioSE ; Nancy ; France ; Novembre 2022 ; Présentation Flash Posters.

Manon JEANDEL, Aurélie ROBERT, Jean-Louis GUEANT, David COELHO.

Interactome of methionine synthase and compartmentalization of methionine synthesis.

Symposium scientifique régional : La recherche dans les maladies rares ; Strasbourg ; France, Février 2022.

Manon JEANDEL, David COELHO, Ziad HASSAN, Rémy UMORET, Jean-Louis GUEANT, Grégory POURIE.

L'administration prénatale de SRT2104, un activateur pharmacologique de SIRT1 réduit les défauts cognitifs associés à une déficience en méthionine synthase chez la souris.

13th International Conference One-Carbone Metabolism B Vitamins and Homocysteine ; Poznan ; Pologne, Septembre 2021.

Manon JEANDEL, David COELHO, Ziad HASSAN, Rémy UMORET, Jean-Louis GUEANT, Grégory POURIE.

Prenatal administration of SRT2104, a SIRT1 activating compound, reduces the cognitive defects associated with methionine synthase deficiency in mice.

Communications posters

Journée Scientifique de l'école doctorale BioSE ; Nancy ; France ; Avril 2024.

Manon JEANDEL, Aurélie ROBERT, Jean-Louis GUEANT, David COELHO.

A novel subcellular location of methionine synthase sheds light on its importance in the regulation of epigenomic mechanism.

Colloque scientifique sur les maladies rares ; Nancy ; France, Mars 2024

Manon JEANDEL, Aurélie ROBERT, Jean-Louis GUEANT, David COELHO.

Une nouvelle localisation subcellulaire de la méthionine synthase éclaire son importance dans la régulation des mécanismes épigénomiques.

Colloque scientifique sur les maladies rares ; Nancy ; France, Mars 2024

Zeinab ALSALHY, **Manon JEANDEL**, Aurélie ROBERT, Jean-Louis GUEANT, David COELHO.

Etude des effets de l'activation de SIRT1 sur la synthèse de SAM.

Autumn School FASEB Science Research Conference: The epigenome in human health and diseases conference ; en ligne, Octobre 2021.

Manon JEANDEL, Aurélie ROBERT, Jean-Louis GUEANT, David COELHO.

Interactome of methionine synthase and compartmentalization of methionine synthesis.

RARE 2021 : Colloque sur les maladies rares ; en ligne, Octobre 2021.

Manon JEANDEL, David COELHO, Ziad HASSAN, Rémy UMORET, Jean-Louis GUEANT, Grégory POURIE.

L'administration prénatale de SRT2104, un activateur pharmacologique de SIRT1 réduit les défauts cognitifs associés à une déficience en méthionine synthase chez la souris.

Table des matières

Remerciements	a
Publications et communications	d
Publications	d
Communications orales.....	e
Communications posters.....	f
Table des matières	g
Table des figures.....	l
Table des tableaux.....	q
Listes des abréviations	s
Introduction.....	1
Avant-propos.....	2
Chapitre 1 : Les vitamines clés au cœur du métabolisme des monocarbones.....	4
I. La vitamine B12 ou cobalamine	4
II. La vitamine B9 ou folate.....	10
III. Les autres acteurs vitaminiques impliqués dans le métabolisme des monocarbones	17
Chapitre 2 : Le cycle de la méthionine et ses acteurs clés.....	19
I. Le cycle de la méthionine et les voies alternes dépendantes de la méthionine	19
II. Les enzymes clés des voies d'utilisation de la méthionine	22
III. Les substrats	29
Chapitre 3 : Les défauts génétiques du métabolisme de la vitamine B12 et leurs conséquences physiologiques.....	36
I. Les défauts génétiques affectant l'absorption et le transport	36
B. Déficience en transcobalamine	37
II. Les défauts génétiques affectant le métabolisme intracellulaire et groupes de complémentation associés.....	39
III. Résumé des conséquences physiopathologiques des défauts génétiques du métabolisme de la vitamine B12 et des traitements utilisés.....	52
Chapitre 4 : Le rôle de la méthylation dans la régulation de l'expression des gènes.....	55
I. Généralités	55
II. Définition de l'épigénétique.....	55
III. Les cibles de la méthylation	56

Chapitre 5 : Les interactions protéine-protéine impliquées dans le cycle de la méthionine et la synthèse de SAM	67
I. Généralités	67
II. Les méthodes d'identification d'interactions protéine-protéine	68
III. Les interactions impliquées dans le cycle de la méthionine et dans la synthèse de SAM69	
Chapitre 6 : Rôle clé de la compartimentation subcellulaire dans les interactions entre voies métaboliques et épigénétiques.....	75
I. Généralités	75
II. Compartimentation du métabolisme de l'acétyl-CoA	76
III. Compartimentation du métabolisme du NAD ⁺	77
IV. Compartimentation du cycle des folates	78
V. Compartimentation nucléaire et régulation épigénomique et épigénétique	79
Hypothèse et objectifs	89
I. Une utilisation préférentielle de la SAM produite <i>de novo</i> ?	90
II. Interactome de la méthionine synthase et production locale de métabolites ?.....	90
Résultats	93
Partie 1 : Localisation nucléaire de la méthionine synthase et des enzymes du cycle de la méthionine	94
I. Mise au point de la méthode de fractionnement subcellulaire	94
II. Expression cytoplasmique et nucléaire des enzymes du cycle de la méthionine ...	95
III. Confirmation d'une localisation nucléaire de la méthionine synthase, de la méthionine synthase réductase et des sous-unités MATs	99
IV. Localisation subcellulaire d'une protéine de fusion MS-GFP.....	105
V. Etude <i>in silico</i> des partenaires protéiques potentiels de la MS.....	106
VI. Mécanismes pouvant être impliqués dans la localisation nucléaire de la méthionine synthase.....	107
Partie 2 : Activité enzymatique nucléaire de la méthionine synthase.....	112
I. Tous les métabolites du cycle de la méthionine sont présents dans le noyau.....	112
II. La méthionine synthase est active dans le noyau.....	117
Partie 3 : Les interactions protéine-protéine impliquant la méthionine synthase.....	123
I. Etude des interactions protéine-protéine impliquant les MATs et la MS	123

II. Etude des interactions protéine-protéine impliquant les DNA méthyltransférases et la MS.....	131
Partie 4 : Etude des effets de l'activation pharmacologique de SIRT1 sur les interactions entre MAT α 2, MAT β et SIRT1	134
I. Le traitement au SRT2104 impacte-t-il la viabilité cellulaire ?	135
II. Effet du traitement au SRT2104 sur le niveau protéique de SIRT1	136
III. Effet de l'activation de SIRT1 par le SRT2104 sur la localisation subcellulaire de HuR et de SIRT1.....	137
IV. Effet de l'activation pharmacologique de SIRT1 sur la synthèse de SAM.....	139
V. Effets de l'activation pharmacologique de SIRT1 sur les interactions protéine-protéine.....	139
Discussion.....	147
I. Localisation subcellulaire de la MS et des enzymes du cycle de la méthionine	149
II. Activité enzymatique nucléaire de la MS.....	151
III. Les interactions protéine-protéine impliquant la MS.....	152
IV. Effet de l'activation pharmacologique de SIRT1 sur la modulation des interactions protéiques et la synthèse de SAM	154
Conclusions et perspectives	157
Localisation subcellulaire de la MS et des enzymes du cycle de la méthionine	158
Activité enzymatique nucléaire de la MS.....	159
Les interactions protéine-protéine impliquant la MS.....	159
Effet de l'activation pharmacologique de SIRT1 sur la modulation des interactions protéiques et la synthèse de SAM	159
Conclusion générale	160
Matériels et méthodes.....	161
Fiche 1 : Culture cellulaire	162
Fiche 2 : Trypsination des cellules (fibroblastes et HepG2)	163
Fiche 3 : Congélation et décongélation des cellules	164
Fiche 4 : Fractionnement subcellulaire	165
Fiche 5 : Extraction de protéines totales au Lysis Buffer	166
Fiche 6 : Dosage protéique à partir de la méthode BCA assay	167
Fiche 7 : Co-immunoprécipitation.....	168
Fiche 8 : Western Blot	170

Fiche 9 : Immunofluorescence	177
Fiche 10 : Western capillaire (Wes).....	179
Fiche 11 : Duolink proximity ligation assay	181
Fiche 12 : Mesure de l'activité de la méthionine synthase : 5-meTHF marqué au ¹⁴ C.....	184
Fiche 13 : Analyse métabolomique par LCMS/MS.....	186
Fiche 14 : Incorporation d'homocystéine deutérée (Hcy-D4) et mesure au LCMS/MS	189
Incorporation sur cellules vivantes	189
Incorporation <i>in vitro</i> sur fractions cytoplasmiques et nucléaires	190
Analyse métabolomique	191
Fiche 15 : Construction plasmide MTR 144 kDa et transfection dans cellules HEK.....	192
Fiche 16 : Transfection de siRNA sur cellules HepG2.....	198
Fiche 17 : Marquage EdU couplé à IF MS.....	199
Fiche 18 : Mesure du taux de viabilité par MTT.....	202
Annexes	203
Bibliographie	242
Résumé.....	
Abstract	

Table des figures

Figure 1 : Structure chimique de la vitamine B12.	4
Figure 2 : Conséquences d'une carence en vitamines B.	7
Figure 3 : Absorption et transport de la vitamine B12.	8
Figure 4 : Absorption et métabolisme intracellulaire de la B12.	9
Figure 5 : Structure chimique des folates.	11
Figure 6 : Absorption et transport de la vitamine B9.	14
Figure 7 : Métabolisme intracellulaire des folates.	16
Figure 8 : Le métabolisme des monocarbones.	21
Figure 9 : Structure des différents domaines composant la méthionine synthase.	24
Figure 10 : Cycle catalytique et désactivation/réactivation de la méthionine synthase.	25
Figure 11 : Structure des différents domaines constituant la méthionine synthase réductase.	26
Figure 12 : Structure chimique de la méthionine.	30
Figure 13 : Structure chimique de la S-adénosylméthionine ou SAM.	31
Figure 14 : Transport indirect de SAM dans les cellules de mammifères.	32
Figure 15 : Structure chimique de la S-adénosylhomocystéine ou SAH.	33
Figure 16 : Structure chimique de l'homocystéine.	34
Figure 17 : Absorption et transport de la vitamine B12 et les défauts génétiques pouvant affecter ces voies.	39
Figure 18 : Métabolisme intracellulaire de la vitamine B12 et les défauts génétiques associés.	40
Figure 19 : Mutations identifiées du gène LMBRD1 dans le défaut cblF.	41
Figure 20 : Représentation schématique du transporteur ABCD4 et des mutations possibles.	42
Figure 21 : Localisation, organisation structurale et mutations du gène MMADHC.	43
Figure 22 : Localisation, organisation structurale et mutations du gène MMACHC.	45
Figure 23 : Symptômes généraux, neurologiques et ophtalmologiques observés chez des patients cblC.	46
Figure 24 : Epimutation de MMACHC causé par une mutation de PRDX1.	47
Figure 25 : Structure du gène MMAA et positions des différentes mutations identifiées.	48
Figure 26 : Représentation schématique du gène MMAB et localisation des différentes mutations identifiées.	49
Figure 27 : Représentation schématique du gène mut et la localisation des différentes mutations identifiées.	49
Figure 28 : Représentation schématique du gène MTRR et localisation de diverses mutations identifiées.	50
Figure 29 : Représentation schématique du gène MTR et localisation des différentes mutations identifiées.	51
Figure 30 : Principales manifestations cliniques des patients cblE et cblG.	52
Figure 31 : Principales présentations cliniques de la déficience en vitamine B12.	53

Figure 32 : Architecture des domaines composant les différentes méthyltransférases de l'ADN.	57
Figure 33 : Les méthyltransférases responsables de la méthylation de l'ADN et leurs mécanismes de fonctionnement.....	59
Figure 34 : Les effecteurs de la méthylation m6A : writers, readers et erasers.....	60
Figure 35 : Les divers types de méthylation des histones et leur impact sur l'activation ou la répression de la transcription.	64
Figure 36 : Voies de signalisation impliquées dans la synthèse de la phosphatidylcholine. ...	65
Figure 37 : Conversion enzymatique de la phosphatidyléthanolamine en phosphatidylcholine.	66
Figure 38 : Interactions protéine-protéine impliquant MAT α 1.....	71
Figure 39 : Interactions protéine-protéine impliquant MAT α 2.....	72
Figure 40 : Modèle de l'interaction entre MAT β , HuR et SIRT1 et l'effet d'un traitement au resvératrol sur cet interactome.	74
Figure 41 : Compartimentation du métabolisme de l'acétyl-CoA	76
Figure 42 : Balance entre les donneurs de groupements méthyles.	81
Figure 43 : Compartimentation du métabolisme du NAD ⁺ et impact des sirtuines.....	82
Figure 44 : La méthylation épigénétique modulée par les nouveaux intracellulaire de SAM nécessaire dans les réactions de méthylation.	83
Figure 45 : Complexe enzymatique SESAME chez la levure.	84
Figure 46 : Interaction entre l'acyl-coenzyme A synthétase et des histones acétyltransférases.	85
Figure 47 : Hypothèse de transfert de SAM, SAH et homocystéine entre le cytoplasme et le noyau.....	88
Figure 48 : Vérification de l'efficacité de fractionnement subcellulaire cytoplasme/noyau...	95
Figure 49 : Expression de MS, MSR, MAT α 1, MAT α 2, MAT β , MTHFR, CBS et SAHH dans les fractions cytoplasmiques et nucléaires.....	98
Figure 50 : Densitométrie des Western blots MS, MSR, MATs, MTHFR, CBS et SAHH sur fractions cytoplasmiques et nucléaires.....	99
Figure 51 : Localisation subcellulaire de la MS observée par immunofluorescence.	101
Figure 52 : Localisation subcellulaire de la MSR observée par immunofluorescence.....	102
Figure 53 : Localisation subcellulaire de la sous-unité catalytique MAT α 2 observée par immunofluorescence.....	103
Figure 54 : Localisation subcellulaire de la sous-unité régulatrice MAT β observée par immunofluorescence.....	104
Figure 55 : Localisation subcellulaire de la sous-unité régulatrice MAT α 1 observée par immunofluorescence.....	105
Figure 56 : Localisation subcellulaire de la méthionine synthase couplée à la GFP après transfection des plasmides MS-GFP dans des cellules HEK293.	106
Figure 57 : Récapitulatif du nombre d'interactions protéine-protéine prédites par les différentes bases de données pour la MS et la MSR.	107

Figure 58 : Etude de l'O-N-acétylglycosamination de la méthionine synthase par immunoprécipitation de la MS et Western blot.	109
Figure 59 : Etude de la SUMOylation via SUMO-1 de la méthionine synthase par immunoprécipitation et Western blot.	110
Figure 60 : Localisation subcellulaire de la méthionine synthase et marquage des cellules en prolifération par l'EdU visualisées par microscopie confocale.	111
Figure 61 : Mesure des métabolites du cycle de la méthionine dans les fractions cytoplasmiques et nucléaires des cellules HepG2, des fibroblastes contrôles et CblG.	114
Figure 62 : Mesure des métabolites du cycle des folates dans les fractions cytoplasmiques et nucléaires des cellules HepG2, des fibroblastes contrôles et CblG.	115
Figure 63 : Mesure des métabolites de la voie de transsulfuration dans les fractions cytoplasmiques et nucléaires des cellules HepG2, des fibroblastes contrôles et CblG.	116
Figure 64 : Mesure de l'activité enzymatique de la méthionine synthase et cinétique de la réaction après marquage au ¹⁴ C dans les fractions cytoplasmiques et nucléaires des cellules HepG2 et des fibroblastes contrôles (WT).	118
Figure 65 : Schéma d'explication du protocole d'incorporation d'homocystéine deutérée.	118
Figure 66 : Test d'incorporation in vivo sur cellules HepG2 d'homocystéine deutérée.	119
Figure 67 : Cinétique sur 6h d'incorporation d'homocystéine deutérée in vitro sur 100 µg de protéines totales HepG2.	120
Figure 68 : Cinétique d'incorporation de méthionine deutérée (Met-D3) in vitro sur 100 µg de protéines totales HepG2.	121
Figure 69 : Incorporation d'homocystéine deutérée in vitro pendant 60 minutes sur extraits protéiques totaux, fractions cytoplasmiques et nucléaires HepG2 avec ou sans traitement AdoX et avec ou sans ultrafiltration.	122
Figure 70 : Co-immunoprécipitation de la méthionine synthase et analyse de potentielles interactions avec les sous-unités MATs.	124
Figure 71 : Co-immunoprécipitation de MATα2 et analyse des potentielles interactions avec MATβ, MSR et MS.	126
Figure 72 : Visualisation par WES d'une contamination mitochondriale des fractions cytoplasmiques et nucléaires.	127
Figure 73 : WES citrate synthase après modification du protocole de fractionnement en modifiant la vitesse de centrifugation et/ou en ajoutant une étape de lavage.	128
Figure 74 : Co-immunoprécipitation de la MS et western blot contre la MS et MATα2 après modification du protocole de fractionnement.	129
Figure 75 : Confirmation de l'interaction entre la méthionine synthase et MATα2.	130
Figure 76 : Interaction protéine-protéine entre la méthionine synthase et DNMT1 par immunoprécipitation et western blot.	131
Figure 77 : Mise en évidence de l'interaction protéine-protéine entre la méthionine synthase, MATα2 et DNMT3b.	132
Figure 78 : Schéma bilan récapitulant les avancées obtenues par le travail de thèse.	133

Figure 79 : Impact du traitement au SRT2104 sur la viabilité cellulaire des cellules HepG2 et des fibroblastes contrôles.	135
Figure 80 : Analyse du niveau protéique de SIRT1 dans des HpeG2, des fibroblastes contrôles (WT) et CblG non-traités et traités au SRT2104.	136
Figure 81 : Effet de l'activation pharmacologique de SIRT1 au SRT2104 sur la localisation de HuR et de SIRT1 dans les fibroblastes contrôles et CblG.	138
Figure 82 : Effet de l'activation pharmacologique de SIRT1 sur la synthèse de SAM.	139
Figure 83 : Co-immunoprécipitation de MAT α 2 et analyse des potentielles interactions avec MAT β et SIRT1.	140
Figure 84 : Co-immunoprécipitation de SIRT1 et analyse des potentielles interactions avec MAT β et MAT α 2.	141
Figure 85 : Confirmation de l'interaction entre MAT β et MAT α 2.	143
Figure 86 : Confirmation de l'interaction entre MAT β et SIRT1.	144
Figure 87 : Confirmation de l'interaction entre MAT α 2 et SIRT1.	145
Figure 88 : Carte du plasmide MTR-GFP 140-kDa.	192
Figure 89 : Protocole de transfection de siRNA avec l'INTERFERin reagent.	198
Figure 90 : Mélange réactionnel du kit EdU Clk-iT.	200

Table des tableaux

Tableau 1 : Génotype des fibroblastes de patients CbIC, CbIG* et CbIE.	162
Tableau 2 : Récapitulatif des différents volumes de réactifs utilisés en fonction du support de culture cellulaire choisi.....	163
Tableau 3 : Récapitulatif des volumes nécessaires des tampons CER I, CER II, NER ainsi que de cocktail anti-protéase en fonction du nombre de cellules.	165
Tableau 4 : Composition du tampon de lyse.....	166
Tableau 5 : Réalisation de la gamme étalon de BSA.	167
Tableau 6 : Composition du Laemmli 5x.	169
Tableau 7 : Anticorps utilisés pour l'immunoprécipitation.....	169
Tableau 8 : Préparation des différentes solutions de Western Blot.....	170
Tableau 9 : Solution pour préparation des gels de séparation pour SDS-PAGE Tris/Glycine Acrylamide 40%.....	171
Tableau 10 : Référence des réactifs utilisés pour la préparation des gels de concentration et de séparation.....	172
Tableau 11 : Solution pour la préparation des gels de concentration pour SDS-PAGE Tris/Glycine Acrylamide 40%.....	173
Tableau 12 : Références des membranes utilisées pour le transfert.	174
Tableau 13 : Conditions d'utilisation des anticorps de Western Blot.....	175
Tableau 14 : Conditions d'utilisation des anticorps pour les marquages immunofluorescents.	178
Tableau 15 : Condition d'utilisation des anticorps de WES.	179
Tableau 16 : Protocole de préparation des solutions de lavage de Duolink.	181
Tableau 17 : Condition d'utilisation des anticorps de Duolink.	182
Tableau 18 : Préparation des solutions nécessaire à la fabrication du Mix réactionnel.	184
Tableau 19 : Préparation du Mix réactionnel.	184
Tableau 20 : Préparation des standards internes (ISTD).....	186
Tableau 21 : Préparation de la gamme de standards STD 1 à 10.	187
Tableau 22 : Dépôts dans chaque tube.....	188
Tableau 23 : Composition des milieux sélectifs HB et MHB.	189
Tableau 24 : Préparation du mix réactionnel pour l'incorporation d'homocystéine deutérée in vitro.	190
Tableau 25 : Paramètres de l'analyse pour le métabolome du métabolisme des monocarbones (OCM).	191
Tableau 26 : Préparation des échantillons et du MIX pour réaliser la PCR.	193
Tableau 27 : Programme de PCR.....	193
Tableau 28 : Préparation des milieux LB liquide et agar pour la culture bactérienne.....	194
Tableau 29 : Préparation du Mix de digestion.	195

Listes des abréviations

- 5mC : 5-méthyl-cytosine
- 5-MeTHF : 5-méthyltétrahydrofolate
- ABCD4 : “ATP-binding cassette subfamily D member 4”
- ACC : acétyl-CoA
- ACLY : ATP citrate lyase
- ACSS 1 et 2 : acétyl-CoA synthase à chaîne courte
- ADD : région riche en cystéine ou ATRX-DNMT3-DNMTL3
- ADN : acide désoxyribonucléique
- AdoCbl : adénosylcobalamine
- ADP : adénosine diphosphate
- AICAR : 5-aminoimidazole-4-carboxynamide ribonucléotide
- AKT1 : sérine/thréonine kinase 1
- ALKBH5 : “AlkB homolog 5, RNA demethylase” : homologue AlkB de la dioxygénase dépendante de l’ α -cétoglutarate
- AMPK : “AMP-activated protein kinase”
- ANSES : Agence nationale de sécurité sanitaire de l’alimentation, de l’environnement et du travail
- APS : ammonium persulfate
- ARE : élément de réponse antioxydant
- ARN : acide ribonucléique
- ARNr : ARN ribosomique
- ARNt : ARN de transfert
- ATP : adénosine-triphosphate
- BAH : “bromo-adjacent homology”
- BHMT : bétaine homocystéine méthyltransférase

- BSA : “bovine serum albumin”
- Cbl : cobalamine ou vitamine B12
- CBS : cystathionine- β -synthase
- CD320 : récepteur de la transcobalamine
- CDP-choline : cytidine diphosphate choline
- CH₃ : groupement méthyle
- CLEC11A : précurseur du facteur de croissance des cellules souches
- CNCbl : cyanocobalamine
- co-IP : co-immunoprécipitation
- COX-2 : cyclooxygénase 2
- CpG : cytosine point guanine
- CPSF6 : facteur de spécificité de clivage et de polyadénylation 6
- CRM1 : “chromosomal region maintenance 1”
- CXXC : domaine zinc ou domaine riche en cystéine
- DDX1 : “DEAD box polypeptide 1”
- DDX3 : hélicase de l’ARN ATP-dépendante
- DG-CCRF : Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes
- DHF : dihydrofolate
- DHFR : dihydrofolate réductase
- DMEM : “Dulbecco’s modified Eagle medium”
- DMG : diméthylglycine
- DMSO : diméthylsulfoxyde
- DNMT : “DNA methyltransferase” : méthyltransférase de l’ADN
- dTMP : déoxythymine monophosphate
- DTT : dithiolthréitol

- E. coli : *Escherichia coli*
- E2I : ubiquitinyase
- EdU : 5-éthynyl-2'-désoxyuridine
- EF1 α : "eukaryotic translation elongation factor 1 alpha"
- ELAV1 ou HuR : "embryonic lethal abnormal vision drosophila like 1" ; "Human antigen R"
- ERK2 : "extracellular signal regulated kinase"
- Er α : récepteur aux estrogènes
- FAD : adénine dinucléotide flavine
- FI : facteur intrinsèque
- FMN : flavine mononucléotide
- FNR : flavodoxine-NADP⁺ oxydoréductase
- FR : récepteur aux folates
- FTO : FTO α -cétoglutarate dioxygénase dépendante
- G9a : "euchromatic histone lysine methyltransferase"
- GAR : phosphoribosylglycinamide formyltransférase
- GFP : "Green Fluorescent Protein"
- GIF : gène codant le facteur intrinsèque
- GIT1 : "ARF GTPase activating protein"
- GK : répétition de lysine et glycine
- GNMT : glycine N-méthyltransférase
- H₂S : sulfure d'hydrogène
- HAT : histone acétyltransférase
- HB : "homocysteine-D4 buffer"
- HC : haptocorrine
- HDAC : histone déacétylase
- HIF1 α : "hypoxia inducible factor 1 subunit α "

- HKMT : histone arginine méthyltransférase
- HMG-CoA : hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA
- HMT : histone méthyltransférase
- HO-1 : hème oxygénase 1
- HP1 : protéine hétérochromatine 1
- HuR : antigène humain R
- ICAM1 : "intracellular adhesion module 1"
- IP : immunoprécipitation
- IPP : interaction protéine-protéine
- LCMS/MS : chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse en tandem
- LDL : "low-density lipoproteins"
- LMBD1 : "LMBR1 Domain Containing 1"
- LSD1 : histone déméthylase dépendante de la lysine
- m6A : méthylation en position 6 de l'adénosine
- MAE : "methionine-activating enzyme"
- MAPK : "mitogen-activated protein kinases"
- MARE : élément de réponse de Maf
- MAT : méthionine adénosyltransférase
- MCM : méthylmalonyl CoA mutase
- MeCbl : méthylcobalamine
- MEK : "mitogen-activated protein kinase"
- METTL3 et 14 : méthyltransférase sous-unité catalytique du complexe N6 adénosine méthyltransférase
- MG-F : folate monoglutamate
- MHB : "methionine homocysteine-D4 buffer"
- MMAA : "methylmalonic aciduria type A"

- MMAB : “methylmalonic aciduria type B”
- MMACHC : “methylmalonic aciduria and homocystinuria type C protein”
- MMADHC : “methylmalonic aciduria and homocystinuria type D protein”
- MRP1 : “multi drug resistance associated protein”
- MS : méthionine synthase
- MSR : méthionine synthase réductase
- MT : méthyltransférase
- MTA : 5'-méthylthioadénosine
- MTHFD1 : méthylène tétrahydrofolate déshydrogénase 1
- MTHFR : méthylène tétrahydrofolate réductase
- MTT : 3-[4,5-diméthylthiazol-2yl]-2,5-diphényltétrazolium bromide
- mut : méthylmalonyl-CoA mutase
- MYC : MYC proto-oncogène
- NADH : nicotinamide adénine dinucléotide réduit
- NADP⁺ : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
- NAFLD : “non-alcoholic fatty liver disease” : maladie hépatique non alcoolique
- NARS : asparaginyI-ARNt synthétase
- NBD : domaine de liaison aux dinucléotides
- NFκB : “nuclear factor kappa B”
- NLS : séquence d'import nucléaire
- NNMT : nicotinamide N-méthyltransférase
- NO : monoxyde d'azote
- NRF1 : “nuclear respiratory factor 1”
- NSYN : “NOP2/Sun RNA methyltransferase”
- NTD : “neural tube defect” : défaut de fermeture du tube neural
- OHCbl : hydroxocobalamine

- OMS : organisation mondiale de la santé
- p53 : “tumor protein 53”
- PARP : poly-ADP-ribose polymérase
- PBD : “proliferating cell nuclear antigen binding domain”
- PBHD : “polybromo homology domain”
- PBS : “phosphate buffer saline”
- PC : phosphatidylcholine
- PCFT : transporteur des folates couplé aux protons
- Pc-G : complexe Polycomb
- PDC : pyruvate déshydrogénase
- PDRG1 : “p53 and DNA damage regulated 1”
- PE : phosphatidyléthanolamine
- PEMT : phosphatidyléthanolamine-N-méthyltransférase
- PFA : paraformaldéhyde
- PGC1 α : “peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator”
- PG-F : folate polyglutamate
- pH : potentiel hydrogène
- Pi : acide phosphorique dimérique
- PIC : cocktail anti-protéases
- PL : pyridoxal
- PLA : “proximity ligation assay”
- PLD : pyridoxal phosphate
- PMC : pyridoxamine
- PMSF : fluorure de phénylméthylsulfonyl
- PN : pyridoxine
- PPi : tri polyphosphate

- PRC1 : protéine impliquée dans la répression de la transcription
- PRE : élément de réponse Polycomb
- PRMT : arginine méthyltransférase
- PWWP : motif proline-tryptophane conservé
- RAR α : "retinoic acid receptor alpha"
- RBP : protéine liant les ARNm
- RE : réticulum endoplasmique
- RF : récepteurs aux folates
- RFC : récepteur aux folates réduits
- RIP140 : "nuclear receptor interacting protein 1"
- RMN : résonance magnétique nucléaire
- ROS : espèces réactives d'oxygène
- RPS : résonance plasmonique de surface
- SAH : S-adénosyl homocystéine
- SAHH : S-adénosyl homocystéine hydrolase
- SAM : S-adénosyl-méthionine
- SAMIT : module de régulation de la transcription dépendant de la SAM
- SDS : laurylsulfate de sodium
- SF3B3 : "splicing factor 3b subunit 3"
- S-FBP : "folate binding protein soluble"
- SH3 : "domaine SRC homology 3"
- SHMT : sérine hydroxyméthyltransférase
- SIRT1 : sirtuine 1
- SLC25A32 : "solute carrier family 25 member 32" : transporteur de FAD mitochondrial
- SM : spectrométrie de masse
- STACs : "Sirtuin activating compound"

- SUCLG1 : "succinate-CoA ligase GDP/ADP forming subunit alpha"
- SVF : sérum de veau foetal
- TAF7 et 10 : "TATA box binding protein associated factor 1"
- TBP : "TATA Box Binding Protein"
- TC : transcobalamine
- TCA : cycle de l'acide tricarboxylique
- TEV : "tobacco etch virus "
- THAP11 : "THAP domain containing 11"
- THF : tétrahydrofolate
- TS : séquence cible
- TYMS : thymidylate synthase
- VEGFR1 : récepteur 1 du facteur de croissance endothélial vasculaire
- VLDL : lipoprotéines de très faible densité
- WT : "wild-type"
- Y2H : hybridation à 2 levures
- YTHD : "YTH N6-methyladenosine RNA binding protein"
- ZNF143 : protéine à doigt de zinc 143

Introduction

Avant-propos

La régulation de l'expression des gènes est dépendante de modifications épigénomiques des acides nucléiques et des histones. La modification la plus étudiée est la méthylation qui requière la S-adénosyl-méthionine ou SAM comme donneur de groupement méthyle. Ce métabolite crucial est produit par le métabolisme des monocarbone où la méthionine synthase (MS) joue un rôle essentiel à l'interface entre le cycle des folates et le cycle de la méthionine. En plus de son rôle très important dans la régulation de l'expression des gènes, la méthylation est aussi impliquée dans de nombreux processus physiologiques en méthylant les protéines, les ARN, l'ADN ou encore les lipides. De plus, des dysfonctionnements de ces processus de méthylation sont associés à l'apparition de diverses pathologies.

La vitamine B12 est un micronutriment essentiel apporté par l'alimentation d'origine animale. Elle est utilisée comme cofacteur par deux enzymes métaboliques dans la mitochondrie et dans le cytoplasme. Dans le cytoplasme, la méthionine synthase utilise la vitamine B12 comme cofacteur afin de catalyser la reméthylation de l'homocystéine pour former de la méthionine. La méthionine est le précurseur de la SAM qui est le donneur universel de groupement méthyle dans les réactions de transméthylation et dans les modifications épigénomiques.

Une carence en vitamines B9 ou B12 ainsi que des défauts génétiques du métabolisme des monocarbone associés à des dysfonctions de l'activité enzymatique de la méthionine synthase induisent une diminution de la synthèse de méthionine et de SAM, avec des altérations épigénomiques associées, et cela malgré la présence de méthionine exogène. En effet, la méthionine n'est pas uniquement produite par le cycle de la méthionine mais est aussi récupérée lors du catabolisme des protéines ou directement dans l'alimentation. Cela suggère que la méthionine exogène n'est pas suffisante pour combler les dysfonctionnements de la MS et donc que la méthionine produite *de novo* joue un rôle clé dans la synthèse de SAM et dans les processus de méthylation.

Il est de plus en plus décrit dans la littérature que les enzymes métaboliques ne sont pas uniquement localisées à un seul endroit dans la cellule mais peuvent posséder diverses localisations subcellulaires en fonction des besoins de l'organisme. Enfin, depuis plusieurs années on commence à s'intéresser aux réseaux entre protéines en essayant d'élucider les relations moléculaires complexes en cartographiant les interactions physiques protéine-protéine. La carte complète des interactions protéine-protéine qui peuvent se produire dans un organisme vivant s'appelle l'interactome. Dans ce contexte, il a été montré que la MS pouvait interagir dans le cytoplasme avec des protéines impliquées dans le transport de la vitamine B12. De plus, de nombreuses études ont mis en évidence que des interactions protéine-protéine permettent une production locale de métabolites induisant une canalisation du substrat. En effet, il existe des interactions entre les enzymes productrices de

SAM et des histones méthyltransférases permettant la synthèse de SAM directement où elle est nécessaire dans les processus de méthylation.

C'est pourquoi nous avons souhaité tester l'hypothèse d'une localisation nucléaire de la MS et étudier les éventuelles interactions protéine-protéine l'impliquant avec les enzymes synthétisant ou utilisant la SAM.

La première partie de ce manuscrit est consacrée à une revue bibliographique expliquant l'importance des vitamines B12 et B9 dans le cycle de la méthionine en exposant les différentes perturbations d'origine génétique de ce métabolisme, mais aussi en exposant l'importance de la méthylation, des interactions protéine-protéine et de la compartimentation métabolique comme clé de la régulation de l'expression des gènes. La seconde partie de ce manuscrit est dédiée à l'exposition des différentes hypothèses de travail ainsi que des objectifs du projet. La troisième partie expose les résultats obtenus sur l'étude de l'interactome de la méthionine synthase et la compartimentation de la synthèse de méthionine. La quatrième partie discute des principaux résultats en concluant sur les mécanismes observés et en ouvrant des perspectives avant de finir par la description des méthodes utilisées lors de ce projet.

Chapitre 1 : Les vitamines clés au cœur du métabolisme des monocarbone

I. La vitamine B12 ou cobalamine

A. Définition, structure chimique et historique

La cobalamine, plus communément appelée vitamine B12 est une molécule organométallique hydrosoluble volumineuse apportée par l'alimentation d'origine animale, en particulier les viandes rouges, les abats, les œufs, les poissons et les crustacés. Cette vitamine est indispensable au bon fonctionnement du système nerveux et à la synthèse des érythrocytes. Elle est formée d'une structure aromatique dont l'atome central est le cobalt. Elle peut être retrouvée sous différentes formes dans l'organisme et dans différents compartiments cellulaires : la méthylcobalamine (MeCbl) dans le cytoplasme, l'adénosylcobalamine (AdoCbl) dans la mitochondrie et l'hydroxocobalamine (OHCbl) retrouvée sous forme circulante. Une dernière forme peut être retrouvée, la cyanocobalamine (CNCbl) qui est une forme non naturelle de vitamine B12 retrouvée sous forme circulante principalement chez les fumeurs (Froese et Gravel 2010) (*Figure 1*).

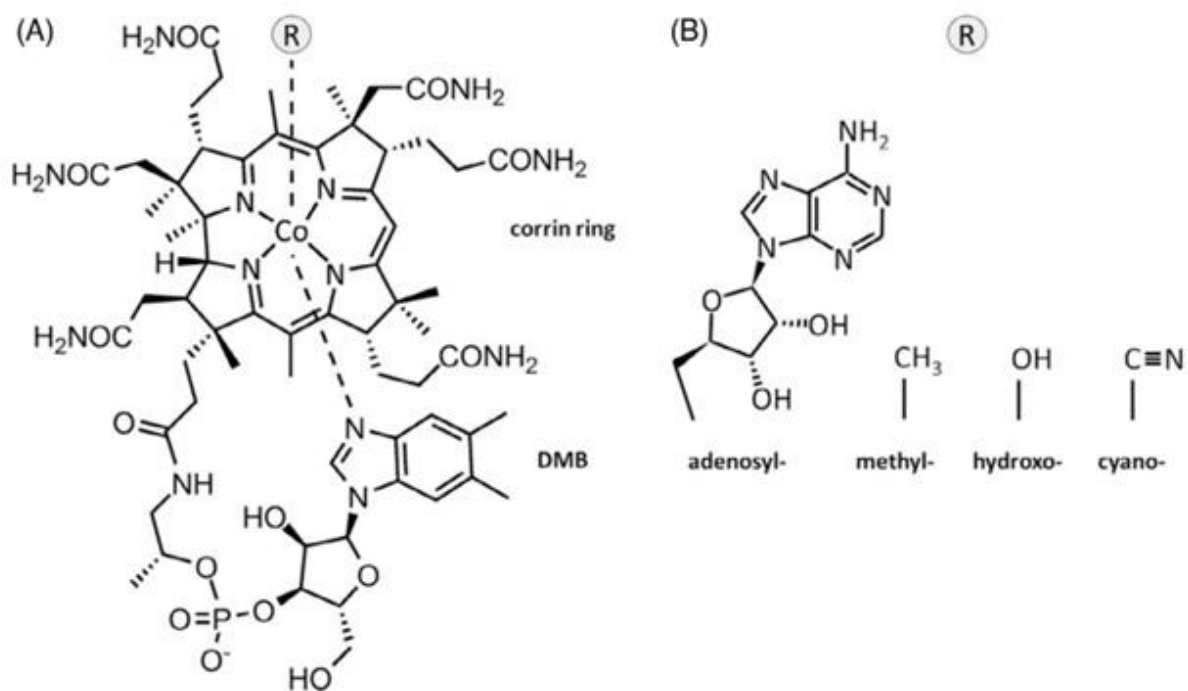


Figure 1 : Structure chimique de la vitamine B12.

A : Structure moléculaire de la cobalamine. Le 5,6-diméthyl-benzimidazol ribonucléotide (DMB) coordonne l'atome central de cobalt en tant que ligand axial inférieur tant que le ligand axial supérieur nommé R peut varier. La cobalamine possède un groupement nommé R variable relié à l'atome de cobalt central qui permet de définir sa fonction. B : Structure moléculaire des groupements R variables.

(McCorvie et al. 2023)

La vitamine B12 est constituée d'un noyau corrinoïde qui est un macrocycle presque plan contenant quatre molécules de pyrrole réduites reliées par leur position α au centre desquelles se trouve un atome de cobalt et une structure benzimidazole-ribose-acide phosphorique. En position axiale supérieur par rapport au noyau corrine, se trouve un groupe R variable relié aussi à l'atome de cobalt central. C'est ce groupement R variable qui détermine le nom du composé vitaminique suivant la nature du groupement : méthyle (CH₃), adénosyl (5'-désoxyadénosyl), cyano (CN) ou hydroxy (OH) (R. Banerjee et Ragsdale 2003). L'atome central de cobalt peut subir différentes réactions d'oxydation ou de réduction et donc se présenter sous différentes formes : monovalente, divalente ou trivalente (K. Park et Brunold 2013). Historiquement, la vitamine B12 a été découverte en 1925 par le Dr George Whipple et les Dr George Minot et William Murphy qui ont démontré que des extraits de foie pouvaient interrompre l'évolution progressive de l'anémie pernicieuse (George Hoyt Whipple 1935). Une recherche effrénée qui s'est étendue sur deux décennies a conduit à l'isolement du cofacteur par Lester Smith et Karl Folkers en 1948, ce qui a abouti à un changement radical dans la compréhension et le traitement de l'anémie pernicieuse qui est passé de plusieurs grammes de foie cru à quelques microgrammes d'un composé cristallin rouge (Smith 1948) (Ricketts et al. 1948). La détermination de la structure cristalline par Hodgkin en 1956 ainsi qu'une collaboration transatlantique impliquant les laboratoires Woodward et Eschenmoser ont permis d'aboutir à la synthèse totale de la vitamine B12 (Woodward 1973). Ce fut Dorothy Hodgkin qui fut à l'origine de l'élucidation de la structure tridimensionnelle de la cobalamine et qui reçut le prix Nobel de chimie pour cette découverte en 1964 (Hodgkin et al. 1956).

B. Apport nutritionnel et carence en vitamine B12

La cobalamine est uniquement produite par des bactéries ou des archées bactériennes par voies aérobie ou anaérobie. Les bactéries synthétisant cette vitamine se trouvent principalement dans le rumen des organismes supérieurs, et donc dans la viande de ces derniers. Ainsi, la viande, le lait, les œufs et le poisson sont les principales sources de cobalamine (Lyon et al. 2020) (J.-L. Guéant, Guéant-Rodriguez, et Alpers 2022). Cependant, une étude parue en 2019 a mis en évidence que la co-fermentation du germe de blé avec deux espèces bactériennes différentes (*P. freudenreichii* et *L. brevis*) permettait de produire de la vitamine B12. Cette approche de co-fermentation propose donc une production alternative de la vitamine B12 en enrichissant certains ingrédients de nombreux produits alimentaires. Ces applications pourraient permettre d'accroître l'utilisation de céréales en réduisant les flux de déchets céréaliers et en contribuant à un mécanisme de production de produits d'origine végétale enrichis en B12 (Xie et al. 2019).

Une déficience en cobalamine se manifeste le plus souvent par des symptômes hématologiques et neurologiques. La manifestation la plus répandue de déficience en B12 et la première identifiée est l'anémie pernicieuse. Depuis lors, le spectre s'est considérablement étendu, en commençant par la reconnaissance des manifestations neurologiques et ophtalmologiques : perturbations sensitives et motrices, ataxie, déclin cognitif, troubles

psychiatriques, convulsions, retard mental et démence (Green et al. 2017a). Les apports nutritionnels journaliers recommandés par l'ANSES depuis 2021 mentionnent un apport en vitamine B12 de 0,4 à 2,5 µg/j chez l'enfant de 6 mois à 17 ans, de 4 µg/j chez l'adulte et de 4,5 à 5 µg/j chez la femme enceinte et allaitante.

La carence en vitamine B12 est considérée comme une préoccupation majeure de santé publique par l'OMS et l'ANSES. La déficience clinique en cobalamine avec des manifestations hématologiques et neurologiques classiques est relativement peu commune. Cependant, un statut faible (en dessous de 148 pmol/litre de plasma) ou marginal (entre 148 et 221 pmol/litre de plasma) en vitamine B12 avec absence de problèmes hématologiques ou neurologiques est plus commun, en particulier dans les populations ayant un faible apport d'aliments riches en B12 (végétalien, végan) ou encore dans les population âgées qui sont plus sujettes à des problèmes d'absorption ou d'apport alimentaire (prévalence de 10 à 30%) (Green et al. 2017a) (Andrès et al. 2005). La seconde cause principale de carence en vitamine B12 est une anomalie de l'absorption de la vitamine. Cette anomalie peut être due à une déficience en facteur intrinsèque (FI) permettant l'absorption intestinale de la vitamine B12 (anémie pernicieuse), des chirurgies ou des maladies gastriques (gastrectomie ou réduction gastrique) qui entraîne par la suite une déficience en FI, une atrophie gastrique chronique causée par des médicaments modificateurs de pH, ou une inflammation chronique ce qui induit une mauvaise extraction de la cobalamine des aliments, des maladies pancréatiques qui induisent des problèmes de dissociation entre l'haptocorrine et la cobalamine, des médicaments affectants l'absorption de la vitamine B12 (metformine), des défauts génétiques héréditaires affectant les acteurs du métabolisme de la vitamine B12 ou l'inhalation répétée de protoxyde d'azote ayant un effet inhibiteur de l'enzyme dépendante de la vitamine B12 : la méthionine synthase (Green et al. 2017a) (Lyon et al. 2020) (*Figure 2*).

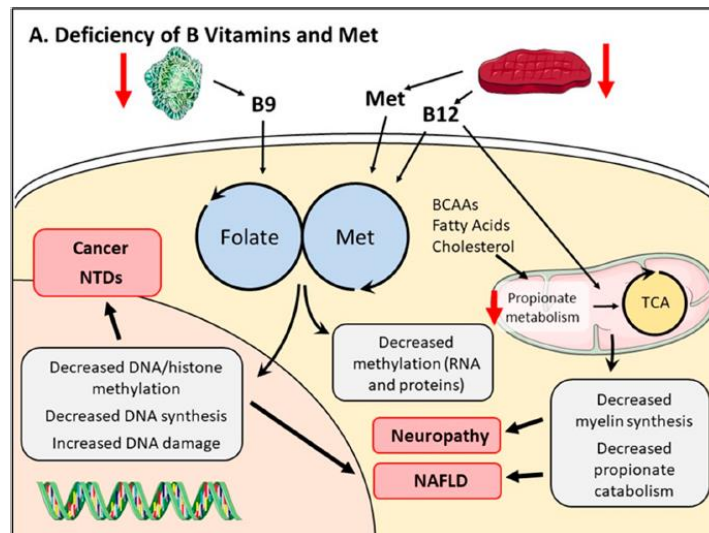


Figure 2 : Conséquences d'une carence en vitamines B.

Les carences en folates, méthionine ou vitamine B12 peuvent causer une diminution du métabolisme des monocarbones induisant une diminution de la synthèse d'ADN, une augmentation de l'instabilité génomique et une diminution du potentiel de méthylation. Cela peut promouvoir le développement d'une mauvaise fermeture du tube neural (NTD), de maladie hépatique non-alcoolique (NAFLD) et du cancer (en particulier le cancer colorectal). Une carence en vitamine B12 peut aussi induire une diminution de la voie catabolique du propionate en impactant l'activité enzymatique de la méthylmalonyl-CoA-mutase (MUT), diminuer la synthèse de myéline, augmenter le stress cellulaire et perturber le cycle de l'acide tricarboxylique (TCA).

(Lyon et al. 2020)

C. Absorption et transport

Lors de la nutrition, nous absorbons toutes sortes de macromolécules qui nécessitent des processus plus ou moins complexes et longs afin de récupérer les molécules indispensables à notre organisme. Au niveau gastrique, la vitamine B12 liée aux protéines alimentaires va être libérée et va se lier à l'haptocorrine (HC), un transporteur présent dans la salive et dans les sucs gastriques (Russell-Jones et Alpers 1999). Le bol alimentaire quitte ensuite l'estomac pour rejoindre l'intestin grêle. Au niveau du duodénum, l'HC sera détruite et la cobalamine pourra se fixer au facteur intrinsèque (FI) qui est produit par les cellules pariétales de l'estomac (Nicolas et Guéant 1994). Lors du passage du complexe FI/cobalamine dans la bordure en brosse des cellules épithéliales de l'iléon, ce dernier va subir deux mécanismes d'absorption : la diffusion passive et l'absorption via Cubam (le récepteur spécifique du complexe FI/cobalamine composé de la cubuline et d'ammionless) (Green et al. 2017a) (J. L. Guéant, Chéry, et Namour 2001) (J.-L. Guéant, Guéant-Rodriguez, et Alpers 2022). Dans les entérocytes, le complexe sera dissocié dans les lysosomes et la vitamine B12 sera libérée dans le cytoplasme afin qu'elle rejoigne la circulation générale via le transporteur de la famille ABC (ATP-binding cassette) situé au niveau basolatéral de l'entérocyte, nommé MRP1 pour ensuite interagir avec la transcobalamine (TC). Ce complexe sera ensuite distribué à toutes les cellules de l'organisme en interagissant avec le récepteur membranaire CD320 (Quadros et al. 2010a). Ces mécanismes d'absorption de la vitamine B12 sont des mécanismes lents et saturables, ce qui induit une assimilation lente et limitée de la cobalamine. Une partie de la vitamine B12 sera transportée vers le foie pour y être stockée (Nielsen et al. 2012) (Figure 3).

Au niveau rénal, l'absorption de la vitamine B12 est due à la filtration rénale et à la recapture du complexe TC/cobalamine par la mégaline un récepteur de la famille des récepteurs au LDL, localisée sur la membrane apicale des cellules du tubule proximal. La mégaline a une haute affinité pour la transcobalamine et prévient donc les pertes urinaires en vitamine B12 (Nielsen et al. 2012). D'après certaines études, la vitamine B12 s'accumulerait dans les lysosomes des reins, ce qui semble indiquer une fonction de stockage dans ces organites particuliers (Birn et al. 2002) (*Figure 3*).

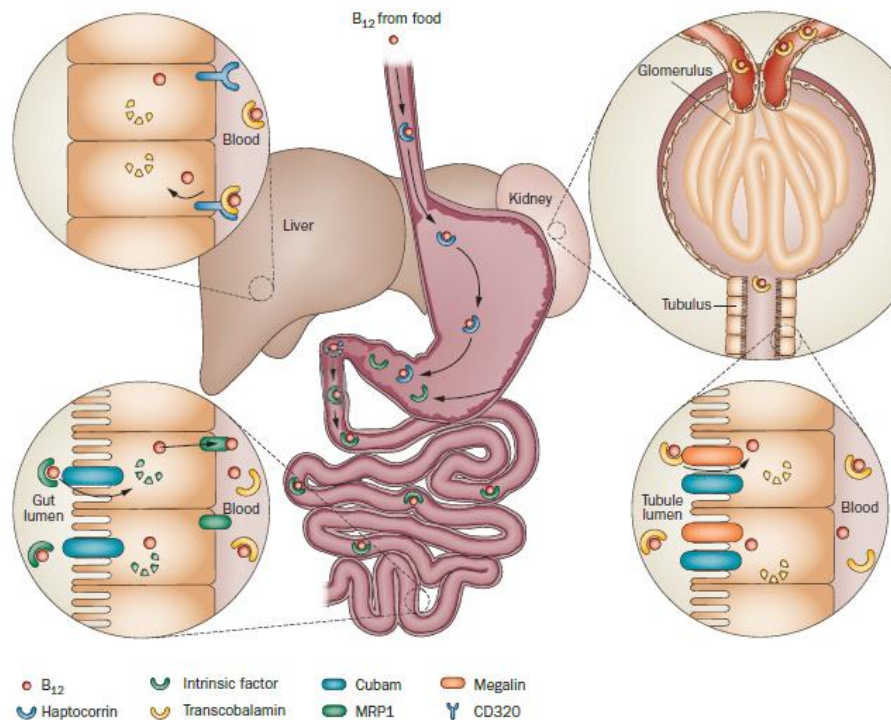


Figure 3 : Absorption et transport de la vitamine B12.

Dans le tractus gastro-intestinal supérieur, la cobalamine est libérée des composant alimentaires et est liée à l'haptocorrine. Lorsqu'elle atteint le duodénum, l'haptocorrine est dégradée par des enzymes et la B12 est capturée par le facteur intrinsèque (FI). Dans l'iléon terminal, le complexe B12/FI est endocytosé par le complexe récepteur Cubam. A l'intérieur de l'entérocyte, le FI est dégradé et la B12 est libérée dans le plasma en sortant de l'entérocyte grâce au transporteur MRP1. La cobalamine est liée à la transcobalamine dans le plasma pour rejoindre les tissus cibles. Dans la plupart des tissus dont le foie, la B12 pénètre dans les cellules via le récepteur CD320. Dans les tubules rénaux, elle entre via la mégaline.

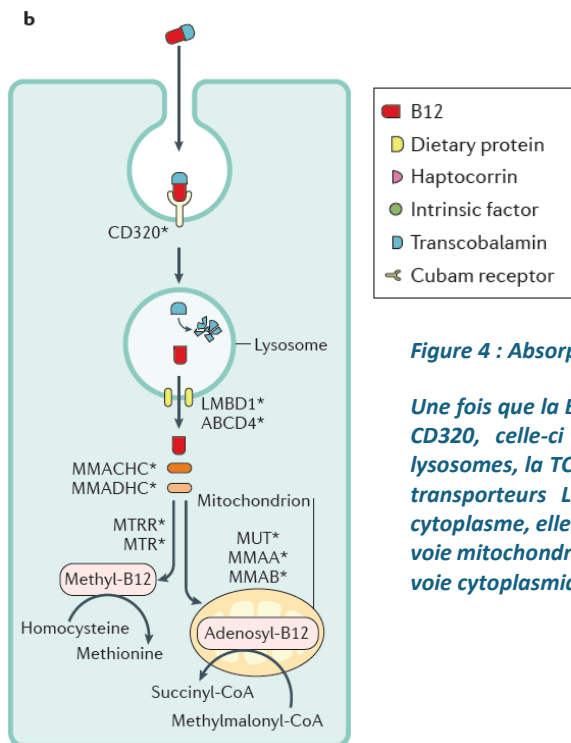
(Nielsen et al. 2012)

D. Rôle de la vitamine B12 et métabolisme intracellulaire

Après endocytose du complexe TC/cobalamine vers les lysosomes, la vitamine B12 est libérée de l'organisme par les transporteurs LMBD1 et ABCD4 qui interagissent ensuite avec la protéine cytoplasmique MMACHC (Plesa et al. 2011). Cette enzyme transforme ensuite les dérivés de cobalamine, alkylcobalamine ou cyanocobalamine en hydroxocobalamine. Un dimère de MMACHC/MMADHC prend alors en charge l'OH-Cbl afin qu'elle rejoigne les deux voies de synthèse en cofacteurs (Deme et al. 2012) (*Figure 4*).

Dans les mitochondries, la vitamine B12 sera convertie en adénosylcobalamine, le cofacteur de la méthylmalonyl-CoA mutase responsable de la conversion de l'acide méthylmalonique, dérivé du malonate, en succinyl CoA (Padovani et Banerjee 2009). Trois protéines majeures vont intervenir dans ce processus mitochondrial : la cobalamine adénosyltransférase (MMAB) qui via son interaction avec une réductase va être responsable de la réduction de la cobalamine en cob(I)lamine qui est la forme nécessaire pour la synthèse d'Ado-Cbl à partir d'ATP. La cobalamine adénosyltransférase associée à la méthylmalonyl-CoA-mutase transfère ensuite l'AdoCbl à la mutase. Pour finir, la protéine MMAA stabilise le complexe Ado-Cbl/mut (R. Banerjee 2006). Lors d'une carence en vitamine B12, on retrouve une augmentation significative des concentrations sériques et urinaires en acide méthylmalonique ce qui entraîne des complications neurologiques. Cela est le résultat d'une perturbation du métabolisme du méthylmalonate (Green et al. 2017a) (*Figure 4*).

Dans le cytoplasme, la vitamine B12 sera transformée en méthylcobalamine, le cofacteur de la méthionine synthase responsable de la reméthylation de l'homocystéine en méthionine à partir du 5-méthyltétrahydrofolate (5meTHF) (Plesa et al. 2011). Au niveau moléculaire, une carence en vitamine B12 aura des impacts sur la capacité de méthylation de la cellule. Une déficience en Me-Cbl induit une accumulation d'homocystéine et une diminution de la synthèse de méthionine et par extension de S-adénosylméthionine (SAM), le donneur universel de groupement méthyle dans les réactions de transméthylation et dans les modifications épigénétiques. L'accumulation d'homocystéine est responsable du stress oxydant, de l'apoptose ou encore de l'homocystéinylation de protéines fonctionnelles dans le sang ou les tissus (Green et al. 2017a) (*Figure 4*).



(Green et al. 2017a)

Figure 4 : Absorption et métabolisme intracellulaire de la B12.

Une fois que la B12 couplée à la transcobalamine (TC) s'est fixée sur le récepteur CD320, celle-ci va être endocytosée et rejoindre les lysosomes. Dans les lysosomes, la TC va être dégradée et la cobalamine va sortir du lysosome via les transporteurs LMBD1 et ABCD4 afin de rejoindre le cytoplasme. Dans le cytoplasme, elle sera prise en charge par MMACHC et MMADHC puis rejoindra la voie mitochondriale où les protéines MMAA, MMAB et MUT entrent en jeux ou la voie cytoplasmique où MTR et MTRR jouent un rôle primordial.

E. Stockage et élimination

La vitamine B12 est stockée dans notre corps dans de très importantes réserves. En effet, la quantité totale de vitamine B12 dans notre corps est estimée entre 2 à 5 mg. Environ 50% de cette quantité va être stockée au niveau hépatique (et l'on retrouve aussi des stocks dans le cœur et la rate) et on estime que 0,1% sera perdu par excrétion intestinale. Les voies d'élimination préférentielles de la vitamine B12 sont la voie passant par la bile et la voie urinaire ce qui correspond à une élimination de 1,1 à 1,5% de la vitamine B12 totale ingérée, soit à 2 à 5 µg de cobalamine (Harte, Chow, et Barrows 1953). Les besoins journaliers en vitamine B12 étant assez faibles (environ 4 µg/jour), notre corps stockera beaucoup de cobalamine au niveau hépatique. Une carence en vitamine B12 ne se manifestera donc que de nombreuses années après l'arrêt complet de l'apport en B12 (Doets et al. 2013).

II. La vitamine B9 ou folate

A. Définition, structure chimique et historique

L'acide folique (ou folate) plus communément appelé vitamine B9 est un micronutriment essentiel apporté par l'alimentation d'origine végétale, principalement par les légumes à feuilles vertes, mais aussi par le foie. Cette vitamine participe au métabolisme des monocarbone en jouant le rôle donneur de groupement méthyle mais est aussi importante dans la synthèse des bases nucléiques constituant les acides nucléiques tels que l'acide ribonucléique (ARN) ou l'acide désoxyribonucléique (ADN) (Scott 1999).

Cette vitamine hydrophobe est constituée d'un anneau ptéridine, d'un acide para-aminobenzoïque et d'une chaîne variable de glutamate (mono- ou polyglutamate). Les doubles liaisons en position N5 et N8 peuvent être réduites par la dihydrofolate réductase (DHFR) formant par la suite le tétrahydrofolate (THF) et le dihydrofolate (DHF) respectivement. Les atomes d'azote localisés en position 5, 8 et 10 sont des sites accepteurs de groupements monocarbonés (Froese, Fowler, et Baumgartner 2019) (*Figure 5*). La structure de base est donc commune à de nombreuses molécules différant par le niveau d'oxydation de l'anneau ptéridine, par la nature du groupement monocarboné et par le nombre de résidus glutamate constituant la chaîne variable. Le THF peut être réduit afin de former différents dérivés comme le N5-formylTHF, N5-méthylTHF, N10-formylTHF ou 5, 10 méthylèneTHF. La forme de folate retrouvée le plus communément dans le sang et dans les tissus est le 5-méthyltétrahydrofolate (5meTHF) (Wright, Dainty, et Finglas 2007).

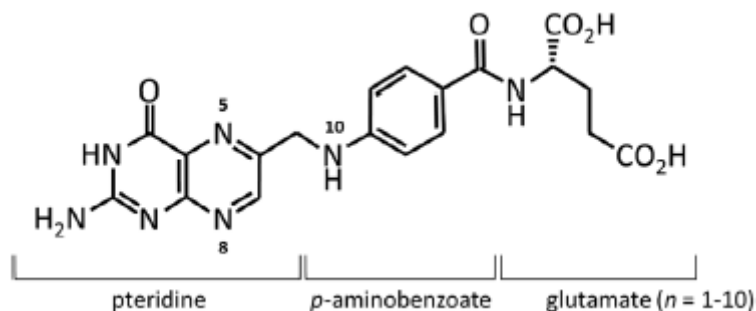


Figure 5 : Structure chimique des folates.

Les atomes d'azote en position 5, 8 et 10 sont des accepteurs d'hydrogène ou de groupements carbonés. La chaîne de glutamate peut être retrouvée sous forme monoglutamate ($n=1$) ou polyglutamate ($n=2-10$).

(Froese, Fowler, et Baumgartner 2019, 201)

En 1931, le docteur Lucy Willis décrit une anémie macrocytaire tropicale chez les femmes enceintes vivant en Inde dans des conditions de régime alimentaire pauvre en fruits et en légumes. Elle mit en évidence qu'un traitement à base d'extrait de levure permettait de contrer cette anémie (Wills 1931). Une étude menée en 1935 mit en évidence que ce même traitement chez des singes était capable de corriger les anomalies sanguines observées. Suite à cette étude, on baptisa les folates « vitamine M » pour les tests réalisés sur les singes (*Monkey*) (Day 1935). Par la suite en 1941, les chercheurs isolèrent cette vitamine et la nommèrent « folate » provenant du latin *folium* pour sa provenance des feuilles d'épinard (Mitchell, Snell, et Williams 1941). En 1955, des chercheurs canadiens suggérèrent que la déficience en folate serait responsable du développement d'anémie mégaloblastique chez la femme enceinte. En 1966, cette même équipe mit en évidence qu'un traitement à l'acide folique administré par voie orale durant la grossesse permettait de faire disparaître l'anémie mégaloblastique (Lowenstein, Brunton, et Hsieh 1966).

B. Apport nutritionnel et carence en vitamine B9

Contrairement aux plantes, les cellules de mammifères ne sont pas capables de synthétiser la vitamine B9. Son apport est donc exclusivement issu de l'apport alimentaire. L'acide folique est retrouvé de manière abondante dans les légumes à feuilles vertes comme les épinards ou encore le fenouil ainsi que dans les fruits, les graines, les levures alimentaires et les abats comme le foie ou les rognons (Lyon et al. 2020). La vitamine B9 est une vitamine hautement sensible à la lumière, à la chaleur ou encore à l'air. Une cuisson trop longue des aliments riches en folate est donc responsable de la destruction de la vitamine. En 2019, la Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes (DG-CCRF) ainsi que l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) publièrent un rapport sur les recommandations sanitaires relatives aux vitamines. D'après ces instances gouvernementales, la quantité maximale recommandée en folates dans la population générale est de 300 μg par jour. Cet apport est susceptible de varier en fonction de l'âge, du sexe ou encore de l'état physiologique. Les références nutritionnelles sont de 100

à 250 µg par jour pour les enfants entre 3 et 18 ans et montent à 450 µg par jour chez la femme durant la gestation.

La carence en folate est de nos jours une des carences les plus fréquentes, que ce soit dans les pays développés ou dans les pays en voie de développement. En effet, l'étude Estéban, menée de 2014 à 2016 en France, a mis en évidence que 13,4% des femmes en âge de procréer présentaient une carence en folate. Cette déficience pose donc un réel problème de santé publique. La carence est induite le plus souvent par un apport insuffisant en aliments contenant de la vitamine B9 ou par une cuisson altérant l'apport, mais elle peut aussi avoir des causes génétiques induisant des malabsorptions intestinales, des troubles du transport ou encore des problèmes dans le métabolisme intracellulaire. Les manifestations cliniques de cette carence sont variées et touchent le système hématologique (anémie mégalo-blastique), le système cardiovasculaire (Lyon et al. 2020) mais aussi le système nerveux (retard mental, troubles cognitifs, défauts de fermeture du tube neural, spina bifida) (Reynolds 2006) (Beaudin et al. 2012) (Beaudin et al. 2011) (*Figure 2*). Depuis 2009, la France a donc mis en place une supplémentation systématique en folates chez la femme enceinte durant le 1^{er} trimestre de grossesse afin de prévenir et de réduire le risque de malformations congénitales (MRC Vitamin Study Research Group 1991) (Centers for Disease Control (CDC) 1991).

C. Absorption et transport des folates

Les folates présents dans l'alimentation sont présents sous la forme de folate polyglutamate (PG-F) mais ne peuvent pas passer la barrière intestinale (Rosenberg et al. 1969). Afin de pouvoir pénétrer dans les entérocytes, les PG-F vont être hydrolysés dans la lumière intestinale par la glutamate carboxypeptidase II (aussi connue sous le nom de polyglutamate carboxypeptidase) chez l'humain et γ -glutamyl hydrolase chez le rat (Shafizadeh et Halsted 2007). L'absorption des folates se réalise au niveau du duodénum et du jéjunum proximal via 2 phénomènes : un transport actif à pH acide (« *proton-coupled folate transporter* » (PCFT)) (Qiu et al. 2006) et une diffusion passive à pH physiologique et lorsque les concentrations en folates sont supérieures à 10 µM (Matherly et Goldman 2003). Les PG-F sortiront ensuite des entérocytes par les transporteurs MRP1, 3 et 5 (*multi drug resistance associated protein*) pour entrer dans la circulation via la veine porte afin de rejoindre le foie et d'être acheminés vers les différents tissus (Kruh et Belinsky 2003) (*Figure 6*).

Au niveau de la circulation sanguine, la vitamine B9 sera liée soit à un ligand de faible affinité comme l'albumine soit à un ligand de forte affinité comme les « folate binding proteins solubles » (S-FBP). Le transport vers le foie s'effectue avec les S-FBP. En ce qui concerne le transport cellulaire, ce dernier s'effectue via 3 systèmes de transports. Trois types de récepteurs permettent donc l'absorption et le transport des folates dans l'organisme (*Figure 6*).

Le 1^{er} type de récepteur est le transporteur des folates réduits ou RFC. Ce transporteur est codé par le gène humain *RFC* localisé sur le chromosome 21 en position q22.3 (Sirotnak et

Tolner 1999). Il s'agit d'un échangeur anionique ubiquitaire permettant le transport de folate à pH physiologique ; de forte affinité pour les folates réduits comme le 5meTHF ou le N5-formyltétrahydrofolate (5formylTHF). C'est une protéine transmembranaire, retrouvée plus massivement dans les tissus assurant l'homéostasie des folates comme l'intestin, le colon, les glomérules rénaux, le foie et le système nerveux central (R. Zhao, Matherly, et Goldman 2009).

Le 2^{ème} type de récepteur est le récepteur de folates (FR). Il s'agit d'une protéine liant les folates de haute affinité codée par 3 gènes différents (α , β et γ) localisés sur le chromosome 11. Ce transporteur est localisé de manière disparate dans les tissus (Salazar et Ratnam 2007). En effet FR α est retrouvé au niveau des cellules épithéliales des reins, de la rétine, de l'utérus, du placenta et au niveau du plexus choroïde (Parker et al. 2005) alors que FR β est exprimé au niveau du placenta, du thymus et de la rate (Reddy et al. 1999). Ce sont des récepteurs particulièrement observés sur les tumeurs de types carcinomes ovariens ou utérin car ils sont régulés négativement par les œstrogènes (Parker et al. 2005). Le mécanisme de transport qu'utilisent les FR est de type endocytose, l'invagination de la membrane plasmique et la formation d'endosome emprisonnant la vitamine B9 (Salazar et Ratnam 2007).

Le dernier type de récepteurs est le transporteur aux folates couplé aux protons (PCFT). Ce récepteur est codé par le gène *PCFT* localisé sur le chromosome 17 en position q11.2 (Qiu et al. 2006). Il s'agit d'un transporteur électrogénique de type symporteur permettant le transport de folates et de protons. PCFT est une protéine transmembranaire retrouvée au niveau des cellules apicales des entérocytes du duodénum et du jéjunum proximal, ainsi que dans le foie, les reins, le placenta, la rétine et le système nerveux central (Inoue et al. 2008) (R. Zhao, Matherly, et Goldman 2009).

La biodisponibilité métabolique en folates dépend de la captation intestinale et tissulaire associées à la présence des récepteurs membranaires. Elle dépend aussi de la capacité de rétention de la vitamine B9 au sein des tissus associée à l'ajout des résidus glutamate (Steinberg 1984) (*Figure 6*).

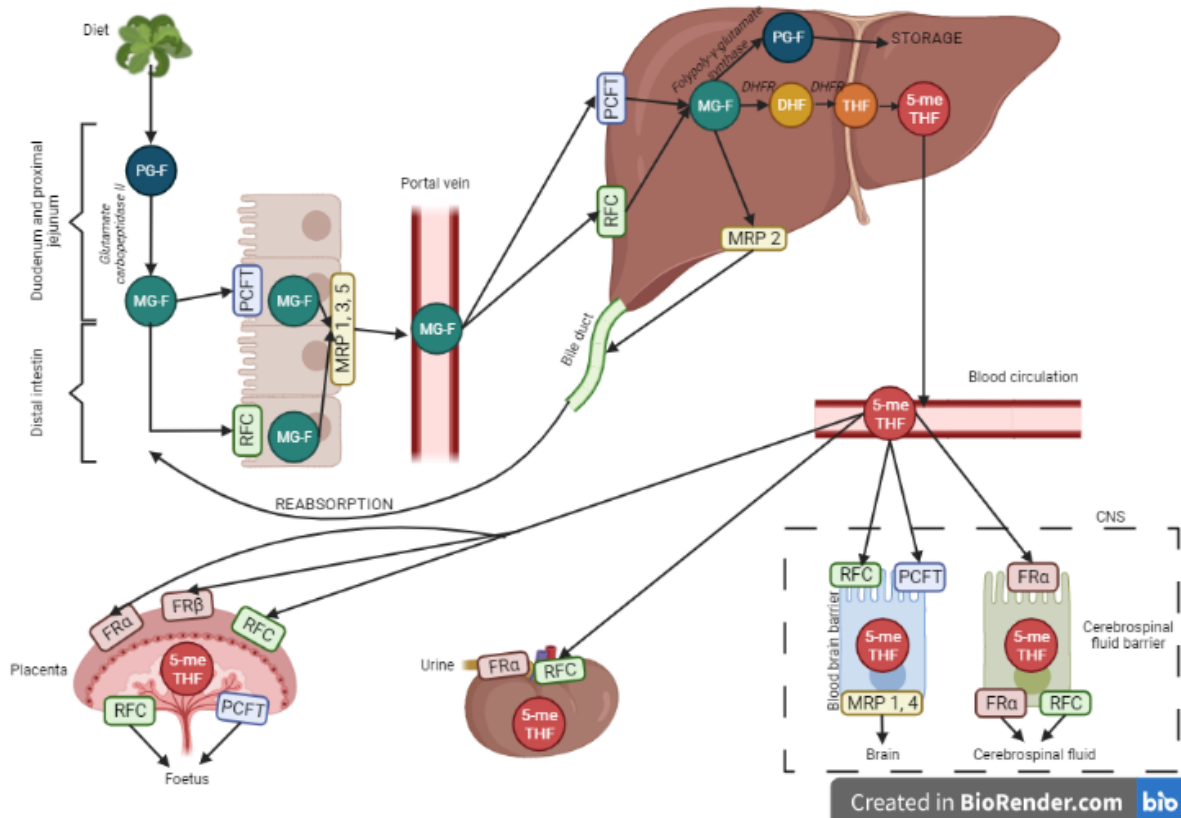


Figure 6 : Absorption et transport de la vitamine B9.

Une fois ingéré via l'alimentation les polyglutamates (PG-F) sont convertis en monoglutamates (MG-F) dans le duodénum. Les MG-F pénètrent ensuite les entérocytes via les récepteurs PCFT (transporteur aux folates couplé aux protons) et RFC (transporteur des folates réduits). Les MG-F sortiront ensuite via les transporteurs MRP1, 3 et 5 (multi-drug resistance associated protein) pour rejoindre la circulation sanguine. Ils pénétreront ensuite dans le foie toujours via PCFT et RFC où ils seront reconvertis en PG-F pour le stockage ou en 5-méthyltétrahydrofolate (5-meTHF). Cette forme sortira du foie pour rejoindre la circulation et rejoindra le système nerveux central (CNS), le placenta ou encore le rein via les récepteurs RFC, PCFT et FR α (récepteur aux folates) afin de participer au métabolisme des monocarbones.

(modifié d'après (Steinberg 1984) (R. Zhao, Matherly, et Goldman 2009))

D. Rôle des folates et métabolisme intracellulaire

Une fois entrés dans les cellules hépatiques via les différents transporteurs cités précédemment, les folates monoglutamates vont être métabolisés par la DHFR permettant la formation de 5-meTHF. Le 5-meTHF sera acheminé vers les différents tissus et pénétrera dans les cellules. A l'intérieur de la cellule, le 5-me-THF aura 3 devenir : soit il restera dans le cytoplasme, soit il sera dirigé vers la mitochondrie, soit il ira vers le noyau (Field et al. 2018a) (Figure 7).

Les cycle des folates est responsable de 3 fonctions primordiales de l'organisme : la synthèse des bases puriques et pyrimidiques, la synthèse de méthionine et la conversion de la sérine en glycine.

Voie cytoplasmique

Le métabolisme des folates est hautement dépendant de la présence de formate qui est un intermédiaire métabolique capable de traverser la membrane mitochondriale. Au niveau cytosolique, la conversion de la sérine en glycine via l'enzyme sérine

hydroxyméthyltransférase (SHMT1) permet la formation de 5,10-méthylèneTHF. Cet intermédiaire métabolique est le substrat de la méthylène tétrahydrofolate déshydrogénase 1 (MTHFD1) permettant la formation de formate. Au niveau mitochondrial, le 5-méthylèneTHF est pris en charge par la MTHFD2 permettant la formation successive de 5,10-méthénylTHF puis de 10-formylTHF. Cet intermédiaire sera catalysé par MTHFD1L (D1 like) afin de former le formate. Dans le cytoplasme, le formate peut provenir du réticulum endoplasmique via des réactions de déméthylation, des peroxysomes via l' α -oxydation des chaînes d'acide gras ou encore de la N-formylkynurenine provenant du tryptophane. Ces différentes sources de formate ne sont pas impliquées dans le métabolisme des folates (Brosnan et Brosnan 2020). La formation de formate se produit dans le cytoplasme et dans la mitochondrie.

Dans le cytoplasme, le 10-formylTHF synthétisé à partir de formate permettra sous l'effet des enzymes AICAR et GAR transformylase, de produire le noyau purine. L'enzyme MTHFD1 permet la production de 5,10-méthylèneTHF qui est utilisé par l'enzyme thymidylate synthase (TYMS) afin de former la thymidylate composant les bases pyrimidines. Sous l'action de la conversion de la sérine en glycine par SHMT1, du THF libre est retrouvé dans le cytoplasme. Il sera transformé en DHF par la dihydrofolate réductase (DHFR) utilisant le NADP⁺ comme cofacteur. Le DHF sera aussi important pour la production de thymidylate. Enfin, le 5,10-méthylèneTHF peut être utilisé par la méthyltétrahydrofolate réductase (MTHFR) afin de former le 5-meTHF impliqué dans la synthèse de la méthionine via le métabolisme des monocarbones (Field et al. 2018a) (Scott 1999) (Carr et al. 2009).

Voie mitochondriale

Au niveau mitochondrial, on retrouve les isoenzymes MTHFD1L permettant la formation de THF libre et de formate à partir de 10-formylTHF (réaction réversible) et MTHFD2 impliqué dans la conversion du 5,10-méthénylTHF en 5,10-méthylèneTHF (ou inversement). On retrouve aussi l'isoenzyme SHMT2 permettant la conversion de la sérine en glycine (réaction réversible) (Zheng et Cantley 2019) (Field et al. 2018a).

Voie nucléaire

Il a été montré récemment par l'équipe de Patrick Stover, que certaines enzymes du cycle des folates ont en plus de leur localisation cytoplasmique, une localisation nucléaire. Cette compartimentation nucléaire serait impliquée dans la synthèse de thymidylate directement au niveau nucléaire. Les enzymes clés impliquées dans le métabolisme des folates ainsi que dans la production de thymidylate comme SHMT1, MTHFD1, DHFR et TYMS, peuvent être SUMOylées afin de rejoindre le noyau (Anderson, Woeller, et Stover 2007) (Field et al. 2018a). La SUMOylation est une modification post-traductionnelle jouant un rôle important dans le trafic entre le cytoplasme et le noyau mais aussi dans la régulation de l'expression génique, la réplication et la réparation des dommages à l'ADN (Hay 2005). On estime que 10% des folates totaux du foie sont impliqués dans le métabolisme nucléaire des folates (Yoon Soon Shin et al. 1976).

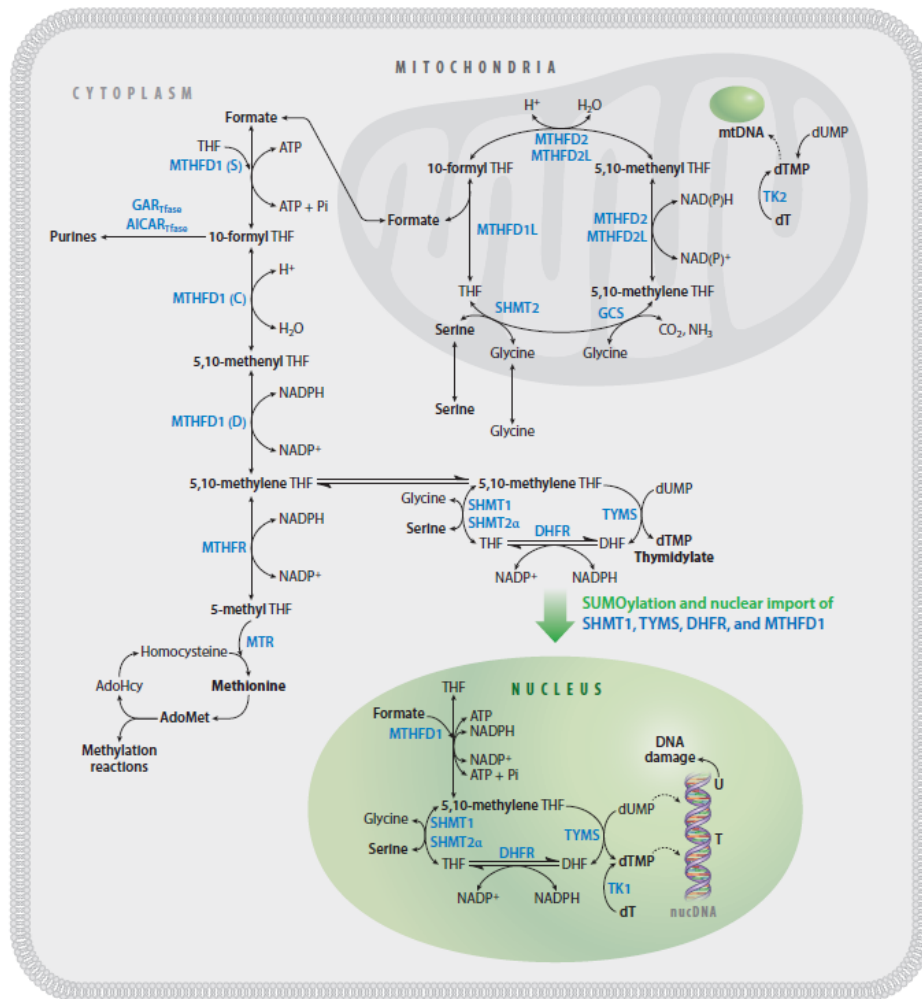


Figure 7 : Métabolisme intracellulaire des folates.

Le métabolisme intracellulaire des folates est un métabolisme compartimenté dans le cytoplasme, la mitochondrie et le noyau.

Abréviations: AdoHcy, S-adenosylhomocysteine; AdoMet, S-adenosylmethionine; AICAR_{Tfase}, aminoimidazolecarboxamide ribonucleotide transformylase; DHFR, dihydrofolate reductase; dT, deoxythymidine; dTMP, deoxythymidine monophosphate; dUMP, deoxyuridine monophosphate; FOCM, folate-mediated one-carbon metabolism; GAR_{Tfase}, glycylamide ribonucleotide transformylase; MTHFD1, méthylentetrahydrofolate déshydrogénase 1; MTHFR, méthylentetrahydrofolate réductase; MTR, méthionine synthase; mtDNA, mitochondrial DNA; SHMT, sérine hydroxyméthyltransférase; SUMO, small ubiquitin-like modifier; THF, tétrahydrofolate; TK, thymidine kinase; TYMS, thymidylate synthase.

(Field et al. 2018a)

E. Stockage et élimination

Le principal lieu de stockage des folates est le foie. Les folates y sont principalement stockés sous forme de 5-meTHF. Cette réserve hépatique en folate permet de maintenir notre apport cellulaire durant 4 mois avant d'être épuisée. En ce qui concerne l'élimination, les folates sont principalement réabsorbés au niveau intestinal via la voie entérohépatique. C'est pourquoi environ 0,5% des folates absorbés via l'alimentation sont éliminés par voie urinaire et biliaire (Ohrvik et Witthoft 2011).

III. Les autres acteurs vitaminiques impliqués dans le métabolisme des monocarbones

A. La vitamine B6

La vitamine B6 est une vitamine souvent oubliée du groupe des vitamines B car les manifestations cliniques des carences en vitamine B6 sont moins sévères que les carences en folates. Cependant, la vitamine B6 est un cofacteur essentiel ayant de nombreuses fonctions de régulation dans le métabolisme du glycogène, la biosynthèse de neurotransmetteurs, le métabolisme lipidique, la synthèse d'acides aminés, la biosynthèse hémique, l'anaplérose ou encore l'homéostasie rédox. Elle peut être obtenue directement de l'alimentation via le poisson, le foie, les céréales fortifiées, les légumes verts à feuilles sombres, les pois chiches ou les pommes de terre (Franco et al. 2022).

Structurellement, la vitamine B6 est une pyridine substituée avec un groupe hydroxyle et un groupe méthyle en position 5 et 6 respectivement. La position 4 est convertie en groupe hydroxyméthyle, formyle ou aminé durant les différents stades de la voie métabolique. Ce sont ces variations qui sont à l'origine des différentes formes de la vitamine B6 à savoir la pyridoxine (PN) contenant un groupement hydroxyméthyle, le pyridoxal (PL) contenant un groupement aldéhyde ou encore la pyridoxamine (PM) contenant un groupement aminométhyle. La forme active de la vitamine B6 correspond au pyridoxal phosphate ou PLP qui est la forme dominante représentant 60 à 70% de la vitamine B6 circulante correspondant à une phosphorylation de la pyridoxine à la place du groupement hydroxyle (Franco et al. 2022; Stach, Stach, et Augoff 2021).

Dans le cadre du métabolisme des monocarbones, le PLP est utilisée par la sérine hydroxyméthyltransférase (SHMT) comme cofacteur pour convertir la sérine en glycine. La sérine peut aussi réagir avec l'homocystéine pour former de la cystéine via la voie de transsulfuration où la cystathionine β -synthase (CBS) et la cystathionine γ -lyase utilisent la forme PLP de la vitamine B6 comme cofacteur (Stach, Stach, et Augoff 2021). Elle est aussi le cofacteur de la bétaine hydroxyméthyltransférase (BHMT) permettant la conversion de la bétaine en diméthylglycine afin de reméthyliser l'homocystéine en méthionine via la voie de secours de la reméthylation dépendante de la BHMT (Lyon et al. 2020)

B. La vitamine B2

La vitamine B2 ou riboflavine est une vitamine hydrosoluble jouant un rôle essentiel comme cofacteur d'enzymes impliquées dans les réactions métaboliques rédox. Les coenzymes flavines sont impliquées dans le métabolisme des acides aminés et dans le métabolisme lipidique. La vitamine B2 est retrouvée dans la microflore du colon et est obtenue par ingestion d'œufs, de diverses graines, des végétaux à feuilles vertes, de légumes ou encore d'abats (Chawla et Kvarnberg 2014). Après son absorption par les colonocytes, la riboflavine est transformée en ses formes biologiquement actives par deux enzymes : la riboflavine kinase

formant la flavine mononucléotide (FMN) et la FAD synthase formant la flavine adénine dinucléotide (FAD). Les flavoprotéines (FMN et FAD) sont impliquées dans la synthèse d'autres cofacteurs comme le coenzyme A, le coenzyme Q, l'hème, le pyridoxal phosphate et de nombreuses hormones (Hrubša et al. 2022). Enfin, la vitamine B2, sous sa forme FAD, est connue pour être le cofacteur de la méthylène tétrahydrofolate réductase (MTHFR), permettant la réduction du 5,10-méthylène tétrahydrofolate en 5-méthyltétrahydrofolate (5meTHF) (Lyon et al. 2020).

C. La choline et la bétaine

La choline est l'un des deux précurseurs de la bétaine avec la glycine. C'est un important donneur de groupement méthyle, précurseur de la formation membranaire et essentiel à la synthèse d'acétylcholine. C'est un acide aminé essentiel obtenu par l'alimentation. La bétaine provient également de l'alimentation et plus particulièrement des poissons, des crustacés, du blé, des épinards ou de l'oxydation mitochondriale de la choline. Elle est un dérivé aminoacide considéré comme le donneur de groupement méthyle impliqué dans la voie de reméthylation de l'homocystéine par la BHMT (Ueland 2011) (Zeisel 2013).

Chapitre 2 : Le cycle de la méthionine et ses acteurs clés

I. Le cycle de la méthionine et les voies alternes dépendantes de la méthionine

A. La voie canonique de reméthylation dépendante de la vitamine B12 : le cycle de la méthionine

Le cycle de la méthionine ou voie de reméthylation de l'homocystéine est retrouvée au niveau cytoplasmique. La vitamine au cœur de ce cycle est la vitamine B12. En effet elle est prise en charge par les protéines MMACHC et MMADHC dans le cytoplasme à la sortie des lysosomes afin d'être amenée vers la voie cytoplasmique ou mitochondriale. La cobalamine jouera un rôle d'accepteur de groupement méthyle en acceptant le groupement provenant du 5meTHF qui formera donc la MeCbl. C'est cette forme de vitamine B12 qui interagira avec la méthionine synthase (MS) pour permettre la reméthylation de l'homocystéine (J.-L. Guéant et al. 2013).

Dans ce cycle, la MS utilisant comme cofacteur la MeCbl va transférer le groupement méthyle de la vitamine B12 sur l'homocystéine afin de former la méthionine. La méthionine sera ensuite utilisée par les méthionines adényltransférases (MATs) pour former la S-adénylméthionine (SAM) grâce à l'ATP. La SAM formée servira alors de donneur universel de groupement méthyle dans les réactions de transméthylation et dans les réactions épigénomiques. Une fois son groupement méthyle transmis, la SAM se retrouve déméthylée et se transforme en S-adénylhomocystéine (SAH). Ce métabolite sera ensuite hydrolysé par la SAH hydrolase (SAHH) formant ainsi l'homocystéine. On estime que l'homocystéine est reméthylée physiologiquement à hauteur de 50 % en méthionine via trois mécanismes bien distincts, deux voies de reméthylation et une voie de transsulfuration. Le mécanisme principal est celui décrit ci-dessus qui est la voie de reméthylation dépendante de la MS ou cycle de la méthionine. Le second mécanisme est une voie de reméthylation de l'homocystéine de secours dépendante de la BHMT et le troisième est se nomme voie de la transsulfuration (Green et al. 2017) (*Figure 17*).

Le cycle de la méthionine est un processus hautement régulé par des hormones qui agissent au niveau transcriptionnel, des métabolites qui activent ou inhibent à différentes étapes du cycle ou encore des métabolites qui modulent l'expression, l'activité, l'oligomérisation de sous-unités. Il a par exemple été montré des changements d'expression de *MAT1A* vers *MAT2A* (gènes codant les sous-unités MATs) dans les hépatocarcinomes de manière semblable à ce qui est observé au niveau fœtal. Ce changement d'isoenzymes induit une diminution de la production de SAM et provoque une modification d'affinité pour la méthionine (Delgado et al. 2014). De plus, il a été montré qu'une douzaine de méthyltransférases présentent des variations de localisation en accord avec leurs fonctions. Cela montre donc que la SAM doit être synthétisée à différents endroits spécifiques pour donner son groupement méthyle. Depuis quelques dizaines d'années il a été décrit une

localisation nucléaire des MATs et de la SAHH ce qui suggère un besoin nucléaire d'un pool d'enzymes pour subvenir aux méthylations épigénomiques (Pérez-Miguelsanz et al. 2017a).

B. La voie de reméthylation dépendante de la BHMT

Il existe 2 voies de reméthylation de l'homocystéine en méthionine : le cycle de la méthionine dépendant de la MS qui est retrouvée de manière ubiquitaire dans l'organisme et la voie dépendante de la bêtaïne homocystéine méthyltransférase (BHMT). Dans les tissus hépatiques et rénaux, c'est principalement la deuxième voie qui est active. Dans cette voie, le groupement méthyle ne provient pas du 5meTHF mais de la bêtaïne transformée en diméthylglycine (*Figure 17*).

La BHMT est un homotétramère fortement conservé composé de sous-unités d'environ 407 résidus contenant chacun un atome de zinc lié à 3 cystéines et 1 tyrosine. L'oxydation de cette enzyme inhibe l'activité enzymatique en relarguant l'ion Zn^{2+} et en produisant un pont disulfure entre 2 cystéines actives. La BHMT a longtemps été définie comme cytosolique et représente environ 1% des protéines totales dans les hépatocytes. Elle a initialement été décrite dans le foie mais est aussi présente en fortes concentrations dans les reins, les yeux ou encore dans la cochlée (Garrido et al. 2005).

Une étude de 2017 a mis en évidence une localisation nucléaire de la BHMT et une activité enzymatique nucléaire de cette dernière 300 fois moins importante que dans le cytoplasme. De plus, ils ont montré qu'en cas de lésions hépatiques, la BHMT nucléaire était surexprimée. Une augmentation des concentrations d'homocystéine au niveau nucléaire est responsable de la N-homocystéinylation des protéines, de l'agrégation de ces dernières et donc de leur perte de fonction. Cette toxicité de l'accumulation d'homocystéine pourrait expliquer la nécessité d'une localisation nucléaire de la BHMT (Pérez-Miguelsanz et al. 2017a).

C. La voie cataplérotique de transsulfuration

La voie de transsulfuration est la troisième voie d'utilisation d'homocystéine de l'organisme. Une fois l'homocystéine produite par la SAH hydrolase, suite à l'hydrolyse de la SAH, cette dernière peut être prise en charge par la cystathionine β -synthase (CBS) dépendante de la vitamine B6 (plus particulièrement de sa forme active : le pyridoxal 5'-phosphate) et utilisant la sérine pour former la cystathionine. Celle-ci sera ensuite prise en charge par la cystathionine γ -lyase (CSE), elle aussi dépendante de la vitamine B6 pour former la cystéine. La cystéine aura ensuite 3 devenir possibles : soit elle est oxydée et forme à la fin de son métabolisme de la taurine et du pyruvate, soit elle est utilisée pour former du glutathion, un anti-oxydant, à partir de glutamate. Enfin, elle peut être utilisée avec l'homocystéine par la CBS et la CSE pour former du sulfure d'hydrogène (H_2S) (Werge et al. 2021) (*Figure 8*). La voie de transsulfuration est donc très utile à la production de glutathion à partir de l'homocystéine. En effet, le glutathion est l'une des molécules les plus importante de détoxification des molécules réactives et des espèces réactives d'oxygène (Schnackenberg et al. 2009).

La CBS est un tétramère formé de sous-unités de 63 kDa. Chaque sous-unité, en plus de pouvoir se lier à l'homocystéine et à la sérine, peut avoir 3 ligands supplémentaires : le pyridoxal-5'-phosphate, la SAM et l'hème. Les protéines de la famille β partagent un noyau catalytique responsable des réactions de β -remplacement ou de β -élimination. Ce site actif est accessible par un canal étroit entouré de 2 feuillets β et de 2 hélices α entre les domaines N et C-terminaux (Zuhra et al. 2020). Il existe une forte coordination entre le cycle de la méthionine et la voie de transsulfuration. En effet, dans le foie on observe une forte activité métabolique et donc de forts taux de méthionine et de SAM. Il existe donc un mécanisme de régulation qui permet à la SAM d'inhiber la MTHFR et d'activer la CBS en se fixant à cette dernière. Cela permet d'induire le catabolisme de l'homocystéine et sa dégradation par la voie de la transsulfuration. A l'inverse, lorsque les taux de SAM diminuent, ces derniers ne peuvent inhiber la MTHFR et activer la CBS, ce qui conduit à une activation du cycle de la méthionine (James D. Finkelstein 2007a).

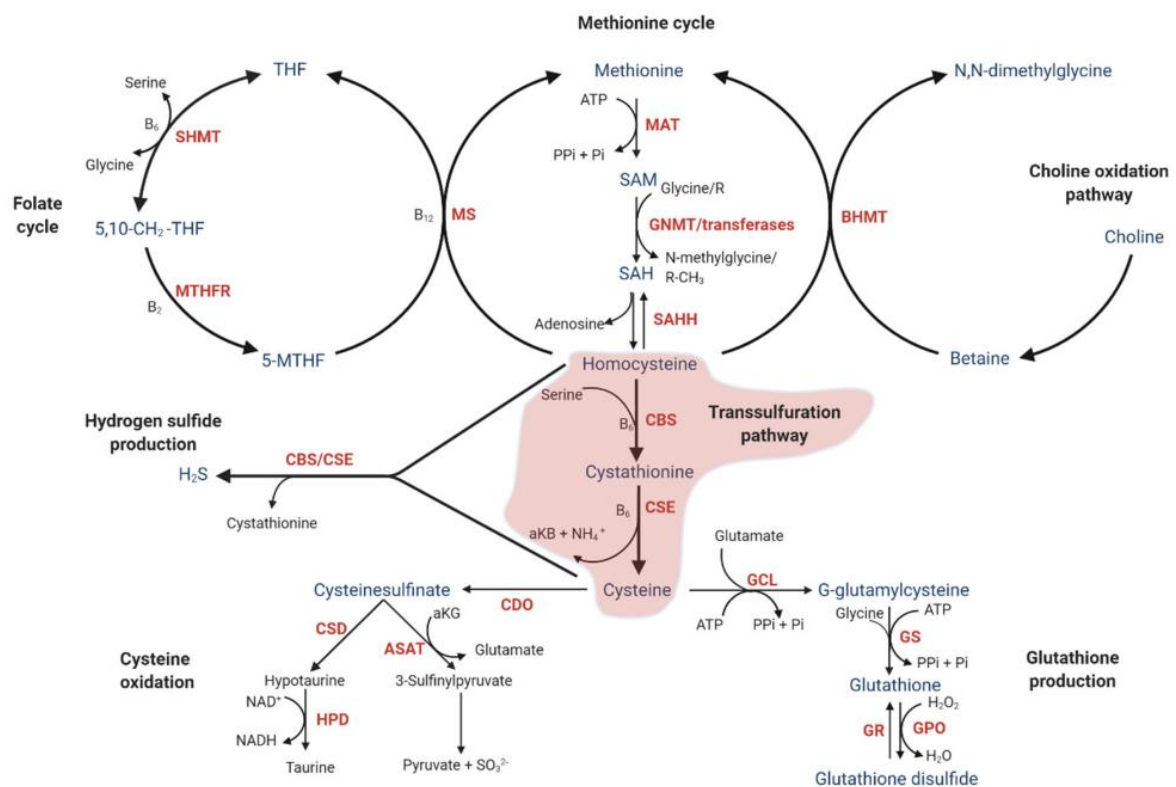


Figure 8 : Le métabolisme des monocarbone.

Abréviations : 5-MTHF, 5-méthyltetrahydrofolate ; 5,10-CH₂-THF, 5-10-méthylènehydrofolate ; α -KB, α -cétobutyrate ; ATP ; adénosine triphosphate ; B₂, riboflavine ; B₆, pyridoxal 5'-phosphate ; B₁₂, cobalamine ; H₂S, hydrogène sulfide ; NH₄⁺, ammoniac ; Pi, phosphate inorganique ; PPi, pyrophosphate ; SAH, S-adénosyl homocystéine ; SAM, S-adénosyl méthionine ; SO₃²⁻, sulfite ; THF, tétrahydrofolate

(Werge et al. 2021)

II. Les enzymes clés des voies d'utilisation de la méthionine

A. La méthionine synthase

Généralités

La méthionine synthase (MS ou 5-méthyltétrahydrofolate-homocystéine méthyltransférase) est une enzyme localisée dans le cytoplasme catalysant la reméthylation de l'homocystéine en méthionine en utilisant la vitamine B12 et plus précisément la méthylcobalamine comme cofacteur. Elle réalise le transfert du groupement méthyle du 5meTHF sur l'homocystéine pour former la méthionine et le tétrahydrofolate (THF). Ce processus est appelé réaction de transméthylation ou voie de reméthylation de l'homocystéine. Il s'agit de l'enzyme au cœur du métabolisme des monocarbone en étant la jonction entre le cycle des folates et le cycle de la méthionine (R. V. Banerjee et Matthews 1990). La méthionine est un acide aminé essentiel uniquement apporté par l'alimentation. Cela était vrai avant la découverte de la méthionine synthase qui est responsable de la synthèse *de novo* de cet acide aminé. Cette enzyme a deux grands rôles clés : premièrement, elle permet la reméthylation de l'homocystéine via le cycle de la méthionine ce qui permet à la cellule de maintenir des taux bas en homocystéine dont l'accumulation est souvent corrélée avec de nombreuses maladies complexes comme les maladies cardiovasculaires (Ganguly et Alam 2015), les mauvaises fermetures du tube neural (Mills et al. 1996) ou encore de nombreuses maladies neurodégénératives (Franken et al. 1996). Deuxièmement, elle déméthyle le 5meTHF, donneur de groupement méthyle afin de former du THF qui sera utilisé par la suite dans la synthèse des bases purines (Col, Oltean, et Banerjee 2007).

Le gène codant la MS

Les premières études menées sur la MS ont été réalisées chez *Escherichia coli*. Chez *E.coli* on retrouve deux enzymes distinctes possédant une activité méthionine synthase. Le gène *metH* produit une enzyme cobalamine-dépendante qui utilise les monoglutamates comme les polyglutamates (différentes formes de folates) pour réaliser une méthylation réductive impliquée dans la synthèse de SAM. Le gène *metE* produit une enzyme cobalamine-indépendante qui nécessite précisément les formes polyglutamates des folates (R. V. Banerjee et Matthews 1990).

Chez l'Homme, la MS est codée par le gène *MTR* localisé sur le chromosome 1 en position 1q43 et possède 55% d'homologie avec l'enzyme *metH* retrouvée chez *E.coli*. La région codante du gène est composée de 33 exons et de 32 introns et code pour une protéine de 1265 acides aminés avec un poids moléculaire de 140 kDa (Muratore et al. 2013).

L'ARNm de *MTR* peut subir un épissage alternatif aboutissant à trois isoformes identifiés (Fofou-Caillierez et al. 2013). Le premier transcrit de *MTR* connu est le transcrit *MTR-001* qui code la forme majoritaire de MS avec 140 kDa. Le second transcrit est *MTR-201* qui contient 31 exons et 30 introns. Il code pour une protéine de 1214 acides aminés tronquée ayant un poids moléculaire théorique de 134,8 kDa. La protéine issue de ce transcrit n'est pas active à cause de l'épissage de 3 exons codants pour le domaine de liaison et d'activation du 5-meTHF. Le troisième transcrit est le transcrit *MTR-002* qui contient 20 exons et 18 introns codant une protéine de 91,8 kDa. Elle ne possède ni de domaine de liaison à l'homocystéine, ni de domaine de liaison et d'activation du 5meTHF. Enfin, il existe 2 autres transcrits *MTR-003* et *MTR-004* qui ne codent pour aucune protéine (Fofou-Caillierez et al. 2013).

La protéine MS

Comme mentionné précédemment, les procaryotes possèdent 2 formes de méthionine synthase MetH et MetE qui utilisent le 5meTHF comme substrat. Par rapport à MetE, MetH a besoin de cobalamine comme cofacteur et est environ 40 fois plus active que l'enzyme MetE (González et al. 1996). Il existe d'autres méthyltransférases qui sont capables de convertir l'homocystéine en méthionine en transférant un groupement méthyle sur d'autres nutriments méthylés comme la glycine, la bétaine et la S-méthylméthionine (Price, Deutschbauer, et Arkin 2021).

La MS humaine est une enzyme B12-dépendante où la cobalamine peut être oxydée par moment puis réduite. La grande partie des connaissances structurelles et fonctionnelles sur cette enzyme découle principalement des recherches menées sur l'enzyme MetH de *E. coli* (R. V. Banerjee et Matthews 1990). La MS humaine est formée de 5 domaines structuraux. En N-terminal, on retrouve le domaine de liaison à l'homocystéine qui comporte les acides aminés 2 à 353 et le domaine de liaison au méthyltétrahydrofolate qui comporte les acides aminés 354 à 649. Ces deux premiers domaines représentent un fragment de 70 kDa. Le troisième domaine est le domaine de liaison à la vitamine B12 qui s'étend des acides aminés 650 à 896 et représente un fragment de 28 kDa. Ce domaine est divisé en 2 sous-domaines constitués du domaine Cap formé de 4 hélices localisées au niveau supérieur de la cobalamine et un domaine Cob ou domaine de Rossmann qui interagit avec la partie interne de l'enzyme (R. V. Banerjee et al. 1989). Le processus catalytique de l'enzyme est basé sur des aller-retour de ce domaine entre les domaines de liaison à l'homocystéine et au 5-me-THF (Evans et al. 2004). Le quatrième domaine est localisé en C-terminal de l'enzyme et comporte les acides aminés de 897 à 1227 représentant un fragment de 38 kDa. Ce domaine est essentiel à la réactivation

de la forme oxydée de la vitamine B12 (Drennan, Matthews, et Ludwig 1994). Enfin le cinquième domaine est celui de liaison à la SAM (Koutmos et al. 2009) (*Figure 9*).

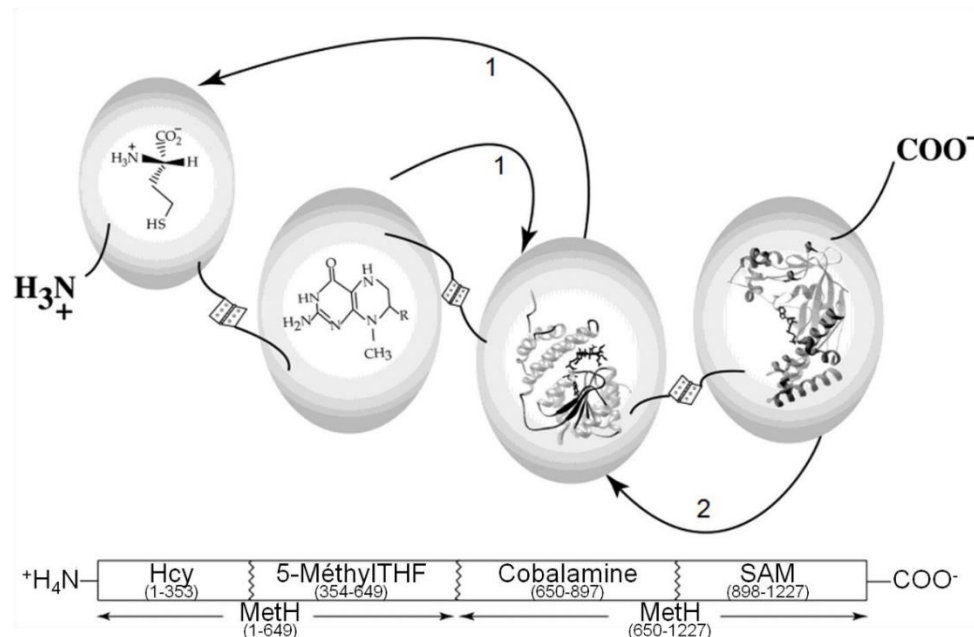


Figure 9 : Structure des différents domaines composant la méthionine synthase.

A : La méthionine synthase (MS) est composée de 5 domaines structuraux : domaine de liaison à l'homocystéine (Hcy), domaine de liaison au 5-me-THF (5-Methyl-THF), domaine de liaison à la vitamine B12 (Cobalamine) et domaine de liaison à la SAM (SAM). B : La MS humaine possède 33 exons.

(J.-L. Guéant et al. 2022a)

La réaction enzymatique de la MS procède en 2 sous-réactions enzymatiques. La première sous-réaction réalise le transfert du groupement méthyle de la méthylcob(III)alamine sur l'homocystéine pour former la méthionine et la cob(I)alamine. La seconde sous-réaction induit une régénération de la méthylcobalamine ainsi que du 5meTHF. De manière occasionnelle, la cob(I)alamine qui est un nucléophile hautement réactif est oxydée en cob(II)alamine ce qui inactive l'enzyme (Mascarenhas et al. 2023b). Chez l'Homme, l'activité enzymatique de la méthionine synthase est restaurée par la méthylation réductrice de la cob(II)alamine par la méthionine synthase réductase (MSR) en utilisant la SAM comme donneur de groupement méthyle (Gruber et Kratky 2006). Ces cycles de réactivation de l'enzyme se produisent environ tous les 100 à 2000 tours du cycle de la méthionine (R. V. Banerjee et Matthews 1990) (*Figure 10*).

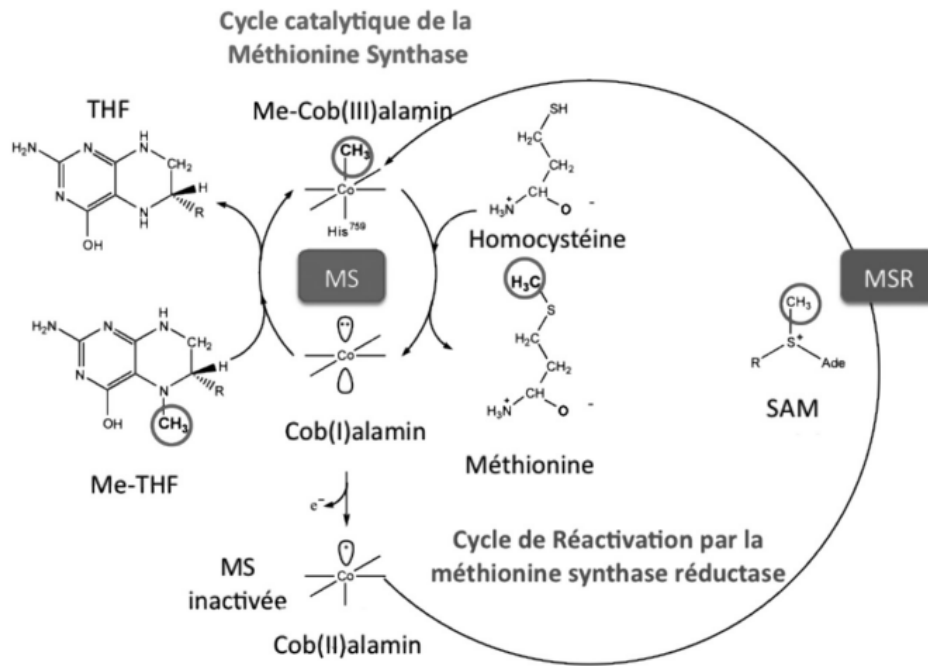


Figure 10 : Cycle catalytique et désactivation/réactivation de la méthionine synthase.

Durant le turnover, la vitamine B12 oscille entre sa forme méthyl cobalamine et cob(I)alamine. De manière occasionnelle cette forme subit une oxydation ce qui rend le cofacteur inactif sous la forme cob(II)alamine. Cette forme inactive pourra de nouveau être méthylée (par la SAM) pour reformer de la méthyl cobalamine et réactiver le cycle.

(J. Guéant, Coelho, et Nicolas 2014)

Certains champignons, plantes ou bactéries ont perdu la capacité d'obtenir de la vitamine B12 ou de synthétiser de la cobalamine *de novo* et possèdent donc uniquement l'enzyme indépendante de la vitamine B12. Chez ces différentes espèces, que les enzymes retrouvées soient dépendantes ou indépendantes de la vitamine B12, ces dernières sont uniquement décrites dans le cytoplasme. Cependant, une étude récente a mis en évidence une autre localisation pour la MS. En effet, cette étude menée sur différentes souches de levures méthylophiques ou non a mis en évidence une localisation nucléaire de la MS. Certains acides aminés ont été identifiés comme essentiels à cette localisation unique au niveau nucléaire. Cette découverte est la première mise en évidence d'une autre localisation subcellulaire de la MS et décrit donc un processus biochimique unique encore non observé dans d'autres espèces (Sahu et al. 2017).

B. La méthionine synthase réductase

Généralités

La méthionine synthase réductase ou MSR est une double flavoprotéine oxydoréductase catalysant la réactivation de la méthionine synthase inactive par reméthylation de la cob(II)alamine en utilisant le groupement méthyle de la SAM (Gruber et Kratky 2006). La MSR est codée par le gène *MTRR* localisé sur le chromosome 5p15.2-15.3 est composé de 15 exons et de 14 introns. Il code pour une protéine de 698 acides aminés ayant un poids moléculaire de 78 kDa (Wolthers et al. 2007).

L'enzyme humaine possède deux domaines similaires à l'enzyme chez *E. coli* où l'on retrouve un domaine flavodoxine et ferrédoxine ou (flavodoxine)-NADP⁺ oxydoréductase (FNR). Les flavines sont des groupements capables de subir des réactions d'oxydoréduction via l'acceptation d'hydrogène le plus souvent sur les atomes d'azote de l'hétérocycle (Yamada et al. 2006). La présence de ce groupement particulier fait que la MSR fait partie de la famille des diflavines transférases d'électrons. Chez les procaryotes, on retrouve dans cette famille une réductase à domaine flavocytochrome P450 BM3 et une sous-unité alpha sulfite réductase. Chez les eucaryotes, cette famille est composée de la réductase cytochrome P450, des synthases de monoxyde d'azote et de l'oxydoréductase NR1. De plus, le gène *MTRR* partage 38% d'homologie avec le cytochrome P450 procaryote (Wolthers et al. 2007).

Les fonctions de la protéine MSR

La MSR est composée de deux domaines de liaison principaux : le domaine de liaison au NADPH/FAD constitué des acides aminés 163 à 698 localisé en C-terminal et le domaine de liaison flavine mononucléotide ou FMN constitué des acides aminés 1 à 233 localisé en N-terminal (Wolthers et Scrutton 2007) (Figure 11).

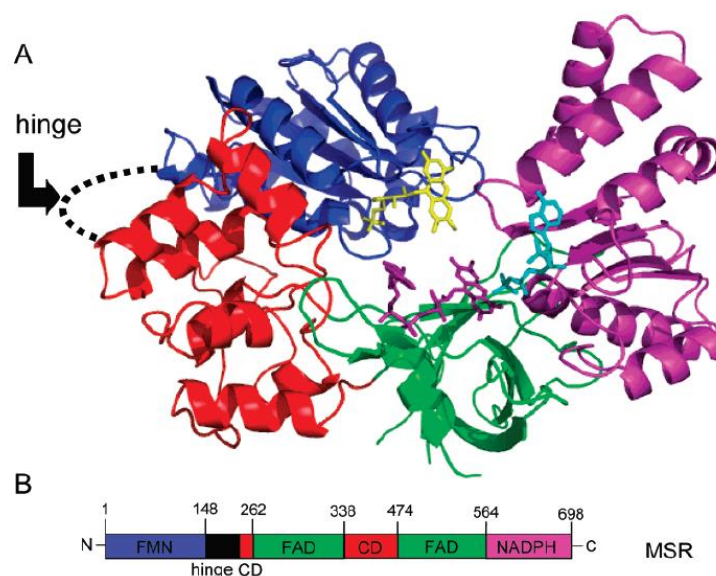


Figure 11 : Structure des différents domaines constituant la méthionine synthase réductase.

En bleu le domaine de liaison FMN, un domaine de connexion en rouge, le domaine de liaison au FAD en vert et au NADPH en rose.

(Wolthers et Scrutton 2007)

Lors du mécanisme de réactivation de la MS, un complexe est formé entre la MS et la MSR. La MSR catalyse le transfert des électrons provenant de l'oxydation du NADPH vers la MS inactive. Le domaine d'activation de la MS situé en C-terminal de l'enzyme interagit avec le domaine de liaison FMN de la MSR pour réaliser cette réaction (J. Zhang et al. 2020a). Des études menées sur le modèle moléculaire de la MSR et des analyses chimiques de réticulation protéique du complexe MS/MSR ont mis en évidence que des résidus acides du domaine FMN étaient capables d'interagir via des interactions électrostatiques avec des résidus basiques du domaine d'activation de la MS induisant donc des changements conformationnels des deux

enzymes caractérisés par des modifications de certains paramètres thermodynamiques comme une augmentation de l'énergie totale ou encore une diminution de l'entropie (Wolthers et Scrutton 2007). De plus, sur la figure 9 une structure charnière « hinge » réalisant un pont entre le domaine de liaison FMN et le domaine de connexion est mentionnée. Cette structure particulière permet des changements conformationnels de la MSR afin qu'elle oscille entre la formation fermée et ouverte. La conformation fermée correspond à une conformation où les domaines FMN et de connexion interagissent ensemble via la charnière. La conformation ouverte correspond à une ouverture de la MSR lui permettant d'interagir avec la SAM et la B12 et donc de réactiver la MS (Wolthers et Scrutton 2007).

C. Les méthionine adénosyltransférases (MATs)

Généralités

Les vertébrés, les plantes, les champignons et probablement d'autres organismes utilisent un groupement méthyle pour leurs processus biologiques de méthylations. Ce phénomène repose sur la réaction de transméthylation qui est hautement dépendante de la formation de méthionine catalysée par la méthionine synthase. Dans cette réaction de transfert de groupement méthyle il a été décrit que l'ATP joue un rôle prédominant. Plus particulièrement, l'ATP possède deux fonctions principales : c'est une source directe ou indirecte d'adénosine qui associée à la méthionine donne l'adénosylméthionine mais aussi une source d'énergie car la liaison méthylsulfonium est équivalente à la liaison phosphate dans l'ATP. En 1957, Cantoni et Durell ont mis en évidence l'enzyme responsable de la transformation de la méthionine en SAM via l'utilisation d'ATP qu'il nommeront « methionine-activating enzyme » ou MAE (Cantoni et Durell 1957). Aujourd'hui ces enzymes sont plus connues sous le nom de méthionine adénosyltransférases ou MATs. Les MATs ne sont pas uniquement retrouvés chez les mammifères.

Une grande partie de la méthionine provenant de l'alimentation est convertie en SAM dans le foie et cet organe regroupe donc environ 85% des processus de méthylation. La première étape du cycle de la méthionine est la conversion en SAM via les MATs. Toutes les cellules de tous les organismes possèdent des enzymes MATs et les gènes codant ces protéines ont exceptionnellement été bien conservés durant l'évolution. Chez les mammifères, trois isoenzymes codées par trois gènes ont été identifiées (Hao et al. 2017). On observe aussi deux isoenzymes chez les levures ce qui suggère qu'une division du travail est fondamentale (Chiang et Cantoni 1977).

Les réactions catalysées par les MATs incluent la catalyse de la réaction entre la méthionine et l'adénosine triphosphate (ATP) pour générer la SAM et du tri polyphosphate (PPi), ainsi que la décomposition du PPi en acide phosphorique dimérique (Pi) via une activité phosphatase (Chiang et Cantoni 1977). Les processus de méthylation sont très importants dans de nombreux processus physiologique : les processus anti-inflammatoires, la synthèse des polyamines et la régulation des taux de méthionine et d'homocystéine. Ces processus ayant lieu grâce à la synthèse de la SAM, le donneur universel de groupement méthyle dans les

réactions de transméthylation, les MATs sont donc des enzymes essentielles au bon fonctionnement de ces processus (Hao et al. 2017).

Les gènes

Chez les mammifères, les MATs sont codées par trois gènes différents. Le gène *MAT1A*, uniquement présent dans le foie, code pour la sous-unité MAT α 1. Les gènes *MAT2A* et *MAT2B* retrouvés de manière ubiquitaire codent pour la sous-unité catalytique MAT α 2 et la sous-unité régulatrice MAT β respectivement (Hao et al. 2017).

Il a récemment été montré que la voie du TGF- β 1 stimule l'activation des cellules stellaires hépatiques en promouvant la phosphorylation de p53, induisant l'expression du gène *MAT2A* et par conséquent diminuant les concentrations de SAM et donc régulant la fibrogénèse (K. Wang et al. 2019).

Les protéines

La sous-unité MAT α 1 peut s'associer en tétramère et former l'enzyme MAT III ou s'associer en dimère et former l'enzyme MAT I retrouvée principalement au niveau hépatique mais aussi dans d'autres tissus chez le rat comme le poumon ou le pancréas (Igarashi et Katoh 2013). Les enzymes MAT I et MAT III sont présentes dans le foie adulte. Les sous-unités MAT α 2 et MAT β peuvent s'associer et former l'enzyme MAT II ubiquitaire et extra-hépatique. La structure présumée de MAT II est MAT α 2₂/MAT β 1. (Igarashi et Katoh 2013). MAT II est responsable de l'élimination de l'excès de méthionine absorbée dans l'alimentation et les enzymes MAT I et MAT III ont pour fonction de maintenir les taux de SAM nécessaires dans le foie dans des conditions de jeûne (Hao et al. 2017).

Les isoenzymes MATs diffèrent par leur Km pour la méthionine qui est d'environ 30 nM pour MAT II, 100 mM pour MAT I et 1 mM pour MAT III (Markham et Pajares 2009). Ces différences reflètent donc une utilisation préférentielle d'une isoenzyme spécifique en fonction des concentrations en méthionine. Par exemple, MAT II est plus active lorsque la méthionine est relativement rare (Igarashi et Katoh 2013).

L'enzyme MAT I est principalement cytoplasmique mais a été retrouvée en faible proportion dans le noyau. En effet, une surexpression de MAT I dans les cellules CHO induit une augmentation de la triméthylation de H3K27 ce qui suggère que MAT I est fonctionnellement couplée à la méthyltransférase responsable de cette méthylation (Reytor et al. 2009a). Chez *Drosophila melanogaster* des mutations modificatrices de type panachure à effet de position (silencing d'un gène par sa juxtaposition anormale avec l'hétérochromatine) et des gènes du groupe Polycomb (Pc-G) ont été utilisées pour identifier des régulateurs de la structure de la chromatine. Le gène *zeste* code pour une protéine de liaison à l'ADN qui reconnaît les éléments de réponses polycomb (PRE) et des régions régulatrices de l'expression génique. Il a été mis en évidence que le gène *Su(z)5* codant une MAT et plus particulièrement pour MAT α 2 est impliqué dans la suppression des mutations de *zeste*. Ces données suggèrent une localisation nucléaire de MAT α 2 et une fonction de silencing de gène chez la drosophile

(Larsson, Zhang, et Rasmuson-Lestander 1996a). De plus, une étude de 2011 a mis en évidence que MAT α 2 pouvait être localisée dans le noyau de nombreux types cellulaires. Ils ont aussi montré que MAT α 2 était recruté sur les éléments de reconnaissance de Maf, une petite oncoprotéine (MARE), pour activer un locus particulier. L'interaction entre des méthyltransférases et le module de régulation de la transcription dépendant de la SAM (SAMIT) suggère donc que la SAM produite par MAT α 2 *in situ* peut être utilisée pour inhiber des gènes cibles. La régulation du flux métabolique par la compartimentation des enzymes est un concept bien établi. La présence nucléaire de MAT α 2 permettrait de coupler la synthèse de SAM à la méthylation de protéines cibles ou à l'ADN via les méthyltransférases (Kato et al. 2011a). Enfin, une étude de 2013 a mis en évidence que MAT α 2 était capable de réprimer l'expression de la cyclooxygénase 2 (COX-2), codée par le gène *Ptgs2* en interagissant spécifiquement avec l'histone H3K9 méthyltransférase SEDB1, promouvant ainsi la triméthylation de H3K9 au niveau du locus de COX-2. MAT II pourrait jouer un rôle important dans la régulation de la méthylation des histones à l'échelle du gène et de l'épigénome (Kera et al. 2013a).

Des changements dans la localisation des MATs ont été recensés au niveau hépatique lors de lésions hépatiques aiguës. Un effet, il a été mis en évidence une accumulation de MAT α 1 au niveau nucléaire en lien avec une augmentation de la triméthylation H3K27me3, une modification épigénétique en lien avec la répression de l'expression des gènes. De plus, il a été montré que les concentrations en glutathion contrôlent la distribution subcellulaire de MAT α 1 en induisant une accumulation de MAT I au niveau du noyau. Cela induit une augmentation des concentrations en SAM ce qui permet *in fine* un remodelage épigénétique. De manière concomitante, une accumulation de SAH hydrolase au niveau nucléaire produit une inhibition des méthyltransférases afin de maintenir l'index de méthylation. Enfin, lors de problème hépatique de type hépatocarcinome, on observe une diminution du glutathion réduit et/ou une augmentation du glutathion oxydé, une augmentation du monoxyde d'azote (NO) et une augmentation des espèces réactives d'oxygène (ROS) induisant une inhibition des enzymes MAT I et III au niveau cytosolique (Delgado et al. 2014).

III. Les substrats

A. La méthionine

La méthionine est un acide aminé essentiel impliqué dans la synthèse protéique. Un acide aminé essentiel ou indispensable est par définition un acide aminé que l'Homme ou d'autres vertébrés ne peuvent pas synthétiser à partir d'intermédiaire métabolique et qui doivent donc être apportés de manière exogène à l'organisme. Cette classification d'acides aminés essentiels ou non remonte aux premières études sur la nutrition humaine qui ont démontré la nécessité de certains acides aminés spécifiques dans la croissance (Baernstein 1932). L'idée générale veut qu'il existe 9 acides aminés essentiels (phénylalanine, valine, tryptophane, thréonine, isoleucine, méthionine, histidine, leucine et lysine) qui en termes de nutrition peuvent être apportés par une seule protéine dite « complète ». Cette protéine complète est

par définition une protéine possédant les 9 acides aminés essentiels (Lopez et Mohiuddin 2023).

La méthionine a été découverte en 1921 par docteur John Howard Mueller. Ce chercheur spécialisé en pathologies, physiologie et métabolisme bactérien s'est intéressé de très près aux exigences de culture des bactéries pathogènes. En effet, quelle que soit la nature des substances qui provoquent la croissance bactérienne, elles sont en grande partie ou entièrement des composants du tissu animal. Pour lui, il était donc très probable que ces substances soient nécessaires au corps animal et fournies par des sources végétales ou synthétisées par l'animal lui-même pour répondre à un besoin métabolique. Il a très rapidement validé ses hypothèses en remarquant que lors de l'utilisation d'un hydrolysât acide de protéines animales, la croissance bactérienne était augmentée. Cela l'a amené à fractionner cet hydrolysât et à découvrir un acide aminé soufré omniprésent : la méthionine (Pappenheimer 1987).

La méthionine est l'un des 4 acides aminés contenant un atome de soufre. Parmi les 3 autres acides aminés soufrés seule la cystéine est incorporée dans les protéines, l'homocystéine, elle, est un intermédiaire métabolique du métabolisme de la méthionine et la taurine est un intermédiaire du métabolisme de la cystéine. De plus, la méthionine contient comme son nom l'indique un groupement méthyle lié de manière covalente à l'atome de soufre (*Figure 12*). Ce sont ces deux parties, le groupement méthyle et l'atome de soufre qui sont cruciaux pour sa structure et pour ses fonctions métaboliques. Le groupement méthyle en position terminale procure à la méthionine un caractère très hydrophobe ce qui fait de cet acide aminé le plus hydrophobe des 20 acides aminés essentiels (Brosnan et al. 2007). On estime que 2/3 des résidus méthionine sont donc retrouvés enfouis à l'intérieur des protéines globulaires (intérieur hydrophobe). De plus, 1/3 de ces protéines contenant un résidu méthionine sont des protéines de surface qui sont donc capables d'être attaquées par des espèces réactives d'oxygène et donc de provoquer l'oxydation du sulfure en sulfoxyde (Brosnan et Brosnan 2006).

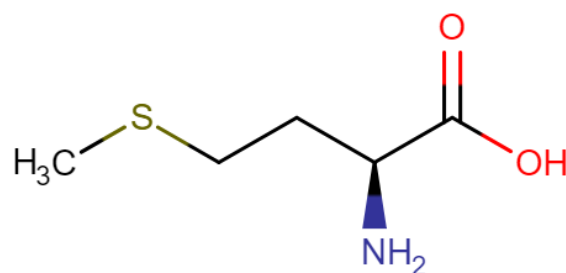


Figure 12 : Structure chimique de la méthionine.

(Human Metabolome DataBase)

B. La S-adénosylméthionine (SAM)

La S-adénosylméthionine (SAM ou AdoMet) est un conjugué de l'adénosine (un nucléotide) et d'un acide aminé, la méthionine qui sont deux composés ubiquitaires retrouvés dans toute cellule vivante (Kozbial et Mushegian 2005). Ce métabolite intermédiaire est impliqué dans de nombreux processus chimiques dont le plus connu est la méthylation de l'ADN, de l'ARN, des protéines, des hormones et des neurotransmetteurs. Ce panel de cibles fait donc de la SAM le donneur universel de groupement méthyle dans tous les organismes vivants (Grillo et Colombatto 2008).

La SAM est un métabolite hautement versatile. Elle possède un groupement sulfure déficient en électrons à cause de la liaison covalente entre l'atome de soufre et d'autres groupements (le groupement méthyle par exemple) (Figure 13). Cet atome de soufre est donc fortement susceptible de subir des attaques nucléophiles qui permettent le transfert du groupement relié à cet atome à d'autres molécules, permettant donc à la SAM de méthyler les protéines ou les acides nucléiques, de participer au métabolisme des acides aminés sulfurés ou encore à la synthèse des polyamines. De par sa structure chimique particulière, la SAM possède donc des fonctions d'orchestration de l'expression des gènes ou encore intervient dans le statut rédox de la cellule (Sun et Locasale 2022).

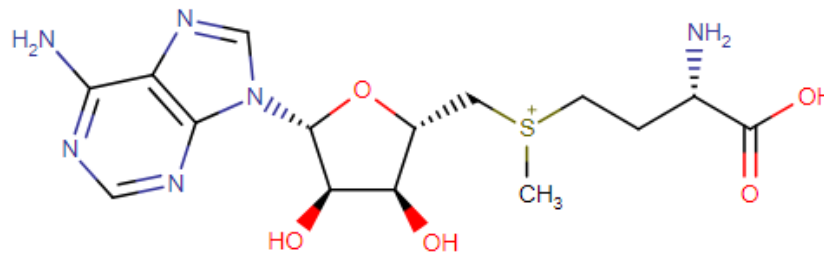


Figure 13 : Structure chimique de la S-adénosylméthionine ou SAM.

(Human Metabolome DataBase)

La SAM peut être retrouvée dans les tissus ou dans le plasma. On estime que l'on trouve une concentration entre 3,5 et 9 nmol/L par 100 mg de tissu et une concentration entre 50 et 150 nmol/L est retrouvée dans le plasma (Inoue-Choi et al. 2012). La nature polaire de la SAM présente un défi pour sa diffusion passive à travers les membranes physiologiques. Des études menées sur des hépatocytes ont montré une faible accumulation cellulaire de la SAM avec un ratio intracellulaire sur extracellulaire de 0,19 $\mu\text{M}/1 \mu\text{M}$ (McMillan, Walle, et Walle 2005). Cela suggère que le mode de transport favorisé pour la SAM est le transport paracellulaire par lequel les molécules se déplacent principalement à travers des jonctions serrées. Cela est en accord avec le fait qu'aucun transporteur de la SAM n'a été découvert dans les cellules de mammifères. D'anciennes études avaient elles mis en évidence un transporteur de SAM chez la levure (SAM3) (Rouillon, Surdin-Kerjan, et Thomas 1999) ou encore dans la membrane mitochondriale humaine (SAMC) (Agrimi et al. 2004). Cette absence de transporteurs dans les

membranes plasmiques des cellules de mammifères complique d'avantage l'absorption de SAM depuis l'environnement extracellulaire. Cela montre bien pourquoi la supplémentation directe en SAM n'a presque pas d'influence sur les cellules car elle n'est pas correctement absorbée par ces dernières.

De plus, il est montré dans la littérature que la SAM est instable à pH 7,5 et qu'elle est capable de se dégrader rapidement en 5'-méthylthioadénosine (MTA) suite à une réaction de clivage non-enzymatique (Wu et al. 1983). Contrairement à la SAM, la MTA est capable de traverser les membranes plasmiques des cellules de mammifères via un système de transport de nucléosides non spécifique grâce à sa structure proche de l'adénosine. Cette molécule est normalement produite durant la synthèse des polyamines. La MTA est souvent recyclée en méthionine durant une série de réactions enzymatiques plus communément appelé « methionine salvage pathway » (Sekowska, Ashida, et Danchin 2019). Cette méthionine nouvellement formée pourra ensuite servir dans le cycle de la méthionine afin de produire de la SAM (Figure 14) (Sun et Locasale 2022).

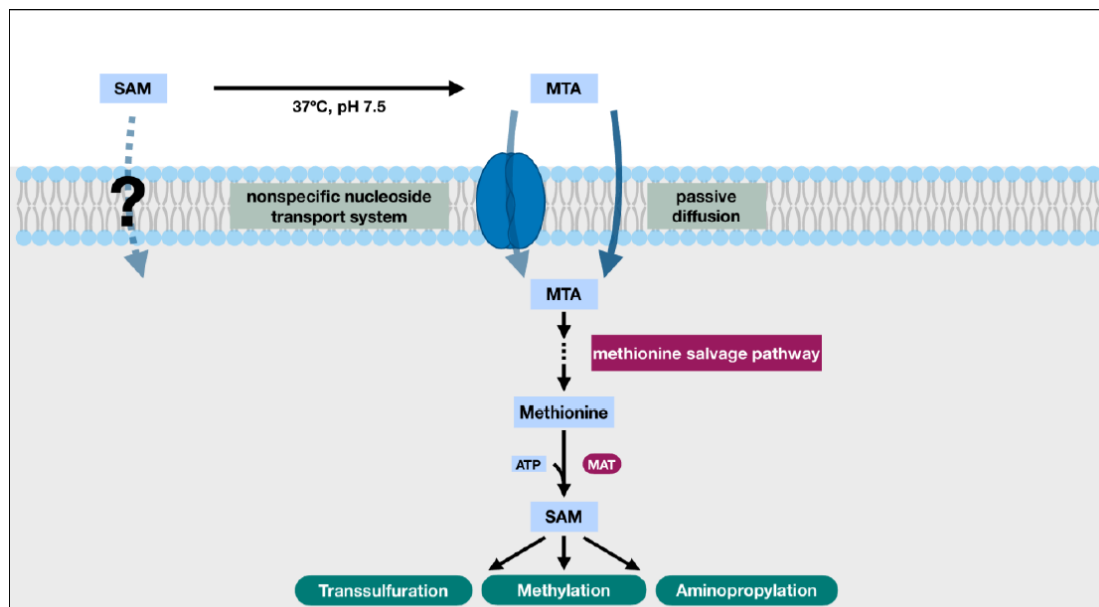


Figure 14 : Transport indirect de SAM dans les cellules de mammifères.

La nature polaire de la SAM et l'absence probable de transporteurs de SAM dans la membrane plasmique posent des problèmes de transport direct de SAM à travers les membranes. Cependant, dans des conditions physiologiques, la SAM se dégrade facilement en MTA (5'-méthylthioadénosine) qui peut traverser la membrane grâce au système de transport non spécifique des nucléosides et à la diffusion passive. Une fois à l'intérieur de la cellule, le MTA peut participer à la voie de sauvetage de la méthionine pour générer de la méthionine qui sera ensuite métabolisée par les MATs (méthionine adénosyltransférases) pour produire la SAM.

(Sun et Locasale 2022)

C. La S-adénylosylhomocystéine (SAH)

La S-adénylosylhomocystéine (SAH ou AdoHcy) est un métabolite ou dérivé d'acide aminé issu de la déméthylation de la SAM lors du transfert du groupement méthyle de cette dernière vers diverses méthyltransférases (*Figure 15*). Ce métabolite est un intermédiaire de la synthèse de cystéine et de l'adénosine. De plus, la SAH est le substrat nécessaire à la SAH hydrolase (SAHH) afin de former de l'homocystéine, un acide aminé dont l'accumulation est toxique. Cette réaction enzymatique est réversible entre SAH et homocystéine (James D. Finkelstein 2007b).

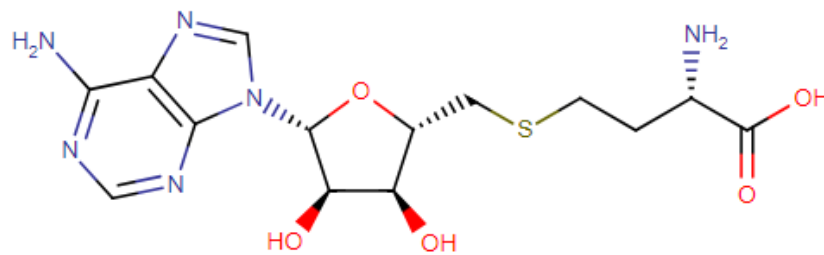


Figure 15 : Structure chimique de la S-adénylosylhomocystéine ou SAH.

(Human Metabolome DataBase)

L'homocystéine peut induire une augmentation des concentrations en SAH, induisant une diminution de la synthèse de la SAM. Cela aura pour conséquence une diminution du ratio SAM/SAH. Ce ratio est plus communément appelé index de méthylation. Ce rapport entre la concentration en SAM et la concentration en SAH renseigne sur la capacité de méthylation de la cellule. En effet, lors de l'augmentation de la concentration en SAH, cette dernière aura un effet de rétrocontrôle négatif sur les méthionine adénylosyltransférases qui synthétisent la SAM. Une diminution des concentrations en SAM aura pour conséquence de diminuer l'apport en groupements méthyles aux diverses méthyltransférases et donc une diminution de la méthylation de diverses cibles (Halsted et al. 2002). Par conséquent, les niveaux de SAH et d'homocystéine sont étroitement liés et la SAH apparaît comme un inhibiteur effectif de la méthylation. En effet, il est montré que l'hypo-méthylation globale de l'ADN est directement proportionnelle avec les concentrations plasmatiques en SAH et homocystéine (Mato et al. 1997).

D. L'homocystéine

L'homocystéine ou acide 2-amino-4-mercaptobutyrique est un acide aminé non protéinogénique contenant un sulfhydryle (SH) dérivant de la méthionine. Elle fut synthétisée pour la première fois en 1932 par le docteur Vincent du Vigneaud qui étudiait le sulfure de l'insuline. Ce chercheur travaillait sur un large panel de molécules allant de l'insuline à la cystéine, en passant par la méthionine, la biotine, l'ocytocine et la vasopressine. Toutes ces molécules avaient un point commun : une chimie et un métabolisme du soufre. Au cours de ces recherches, il a découvert que l'homocystéine pouvait soutenir un régime sans méthionine chez les rats uniquement si de la choline était ajoutée au régime. Sur la base de ces

découvertes, il émet l'hypothèse que la choline agit comme un donneur de groupement méthyle pour la conversion de l'homocystéine en méthionine (Du Vigneaud et al. 1974). De plus, il soupçonnait que la méthionine pouvait servir de source de méthyle pour la synthèse de choline, ce qu'il prouva en suivant les groupements méthyles via un marquage au deutérium de la méthionine (Kresge, Simoni, et Hill 2004).

Concernant sa structure, l'homocystéine est un homologue de la cystéine contenant un thiol formé par la déméthylation de la méthionine (*Figure 16*). Contrairement à la cystéine qui entre dans la composition des protéines, l'homocystéine n'y prend pas part mais est recyclée en méthionine ou convertie en cystéine par des enzymes du cycle de la méthionine utilisant comme cofacteur les vitamines B12 et B6 (J. D. Finkelstein et Martin 2000).

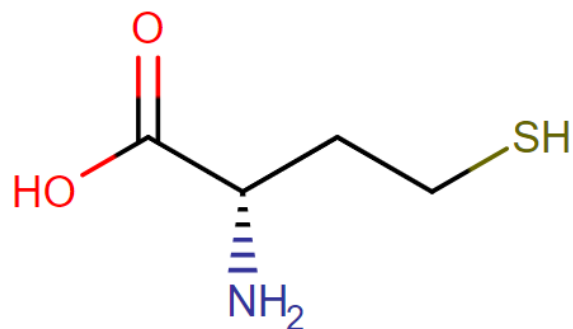


Figure 16 : Structure chimique de l'homocystéine.

(Human Metabolome DataBase)

Les concentrations en homocystéine sont régulées par deux voies de signalisation clés qui sont la reméthylation de cette dernière pour former de la méthionine (via la MS ou la BHMT) ou la voie de transsulfuration produisant la cystéine et du sulfure d'hydrogène (H₂S). La concentration en homocystéine peut être augmentée dans diverses conditions incluant des facteurs génétiques, l'alimentation, le style de vie, des médicaments, etc. C'est ce que l'on appelle l'hyperhomocystéinémie. On distingue généralement trois types d'hyperhomocystéinémie qui sont modérée (entre 15 et 50 µmol/L), intermédiaire (entre 50 et 100 µmol/L) ou sévère (au-dessus de 100 µmol/L) en fonction de la concentration plasmatique en homocystéine (J. D. Finkelstein et Martin 2000). Ces niveaux élevés d'homocystéine induisent une hyperhomocystéinémie qui est un facteur de risque de maladies neurovasculaires, de démence, de migraines, de maladies neurodégénératives comme Alzheimer ou Huntington ou encore de problèmes neurodéveloppementaux (Franken et al. 1996). Les mécanismes sous-jacents à cette toxicité neurologique de l'homocystéine sont le stress oxydant, les dommages à l'ADN, la thiolation des protéines ou encore l'homocystéinylation des protéines induisant l'apoptose de ces dernières et une excitotoxicité (altération et destruction neuronale ou neurotoxicité). De plus, l'hyperhomocystéinémie est impliquée dans l'installation d'une inflammation chronique en augmentant les niveaux de diverses cytokines et en modifiant le profil de méthylation de l'ADN. Enfin, ce processus est aussi responsable d'une diminution de la production de H₂S connu pour avoir normalement

une fonction neuroprotectrice ce qui ajoute encore un effet neurotoxique à l'homocystéine (Hermann et Sitdikova 2021).

Chapitre 3 : Les défauts génétiques du métabolisme de la vitamine B12 et leurs conséquences physiologiques

Les défauts génétiques affectant l'absorption et le transport de la vitamine B12 sont retrouvés à différents niveaux du métabolisme de cette vitamine. En effet, il existe des défauts génétiques affectant l'absorption digestive, la déficience en facteur intrinsèque (FI), le transport sanguin ou déficience en transcobalamine et haptocorrine ou encore affectant le métabolisme intracellulaire de la cobalamine. L'ensemble de ces défauts génétiques qu'ils affectent le transport, l'absorption ou le métabolisme intracellulaire sont hérités d'un trait autosomique récessif et sont classifiés en tant que maladies rares voire très rares (J.-L. Guéant et al. 2014).

I. Les défauts génétiques affectant l'absorption et le transport

A. **Déficience en facteur intrinsèque**

La déficience congénitale en FI est la pathologie la plus classique rencontrée parmi les maladies impactant l'absorption digestive de la cobalamine et représente environ entre 20 et 50 % des causes de carence en vitamine B12 chez l'adulte. Ce défaut est causé par l'absence de synthèse ou par la non-fonctionnalité du FI. Cette maladie est plus connue sous le nom de maladie de Biermer, caractérisée par une anémie pernicieuse (Andrès et al. 2005).

Ce défaut est dû à des mutations du gène *GIF* codant pour le facteur intrinsèque et localisé sur le chromosome 11 en position 11q13. Il code une protéine de 417 acides aminés pour un poids moléculaire de 45 kDa pouvant atteindre 60 kDa en cas de glycosylation (Tanner et al. 2005). Cette déficience en FI peut aussi être causée par des mutations sur les gènes *CUBN* sur le chromosome 10p12.1 et *AMN* sur le chromosome 14q32, codant les parties du récepteur Cubam qui sont la cubuline et l'amnionless. Ce récepteur permet l'absorption par les cellules épithéliales de l'iléon du complexe FI/cobalamine. Ce second type de mutation aboutit aussi à une déficience du facteur intrinsèque qui est plus connu sous le nom de syndrome d'Imerslund-Gräsbeck (Gräsbeck 2006).

Ces différents défauts aboutissant à une déficience en FI affectent les cellules pariétales gastriques qui sont responsables de la production de l'acide chlorhydrique gastrique et du FI. Cela aura donc pour conséquence une altération de la sécrétion du FI qui possède alors une affinité réduite pour la vitamine B12 ou encore une sensibilité importante à la protéolyse (David Watkins et Rosenblatt 2011a). Au niveau de l'intestin et plus précisément de l'iléon, l'absorption de la vitamine B12 est altérée. Les patients atteints par ces défauts génétiques présentent des taux sériques de cobalamine diminués, une hyperhomocystéinémie ainsi qu'une acidémie méthylmalonique, ce qui aura pour conséquences physiopathologiques un retard de croissance, des symptômes neurologiques, mais aussi des symptômes hématologiques de type anémie mégaloblastique le plus souvent détectés chez les patients

âgés de 1 à 5 ans (Martina Huemer et Baumgartner 2019) (David Watkins et Rosenblatt 2011a).

L'absorption intestinale est classiquement étudiée à l'aide du test de Schilling qui mesure l'absorption de la vitamine B12 radiomarquée en présence et en absence de FI exogène. Ce test est anormal en absence de facteur intrinsèque exogène. Aujourd'hui ce test est rarement utilisé en clinique à cause de l'utilisation d'isotope radioactif dans son procédé. Actuellement, des analyses des mutations des gènes concernés sont utilisées pour établir un diagnostic (Tanner et al. 2005). Les traitements de ces patients sont basés sur des suppléments en FI exogène mais uniquement pour les patients présentant des mutations sur le gène *GIF*. Le traitement conventionnel consiste en des injections intramusculaires d'OHCbl ou de CNCbl pour contourner la voie de l'absorption intestinale défectueuse chez ces patients. Le traitement démarre avec 1 mg d'OHCbl administré quotidiennement puis des injections mensuelles une fois que les réserves internes en cobalamine ont été reconstituées. La réponse au traitement est généralement bonne tant que le niveau de cobalamine circulante est maintenu (David Watkins et Rosenblatt 2011a) (*Figure 17*).

B. Déficiences en transcobalamine

La déficience en transcobalamine (TC) touche les patients dans leurs premiers mois de vie et se caractérise par une anémie sévère accompagnée généralement d'un retard de croissance, de vomissements, d'une anémie mégalo-blastique et parfois de complications neurologiques du type retard dans le développement psychomoteur et mental (Cooper et Rosenblatt 1987). Cette maladie touche la transcobalamine qui est la protéine permettant le transport sanguin de la vitamine B12. Ce défaut est dû à des mutations dans le gène *TCN2* situé sur le bras long du chromosome 22 codant une protéine de 43 kDa (Regec et al. 1995).

On estime à plus d'une vingtaine le nombre de mutations recensées du gène codant la TC et responsable d'une déficience en transcobalamine. Ces mutations ont pour conséquences une diminution de la synthèse de la TC ainsi qu'une diminution de la liaison à la cobalamine dans le cas de la production d'une protéine tronquée ou non-fonctionnelle (Cooper et Rosenblatt 1987). Comme seulement 20 % de la vitamine B12 circulante se fixe à la TC, les patients ne sont donc pas caractérisés par une forte diminution des niveaux de cobalamine sériques (Trakadis et al. 2014). Les signes cliniques de cette maladie sont l'anémie macrocytaire, la pancytopenie ainsi que des problèmes immunologiques (agammaglobulinémie, infections récurrentes, diminution du nombre de lymphocytes T et B) (Martina Huemer et Baumgartner 2019).

Le traitement conventionnel pour cette pathologie est basé sur des administrations intramusculaires ou par voie orale d'OHCbl ou de CNCbl dans le but de maintenir des concentrations plasmatiques en vitamine B12 très élevées de l'ordre de 10 000 pg/mL (David Watkins et Rosenblatt 2011a) (*Figure 17*).

C. Déficience en récepteur de la transcobalamine ou CD320

La déficience en CD320 est caractérisée par un déficit en récepteur cellulaire de la transcobalamine situé sur toutes les cellules de l'organisme. Ce récepteur est codé par le gène *CD320* localisé sur le chromosome 19 en position p13.2. Il s'agit d'une glycoprotéine de 58 kDa composée de 282 acides aminés possédant un domaine extracellulaire de 199 acides aminés, un domaine transmembranaire de 21 acides aminés et enfin un domaine cytoplasmique de 32 acides aminés (Quadros, Nakayama, et Sequeira 2009).

Une étude menée sur 5 patients atteints de cette maladie a mis en évidence une délétion de 3 nucléotides dans le gène *CD320* entraînant une perte d'un groupement glutamate dans le domaine extracellulaire ayant pour conséquence une perte de l'absorption de la TC *in vitro* (Quadros et al. 2010b).

Cette mutation entraîne une acidémie méthylmalonique associée à un taux d'homocystéine normal ou élevé mais aucun patient ne présente de phénotype ou de signes cliniques spécifiques de cette mutation. De plus, il a aussi été mis en évidence une augmentation du taux de C3 acylcarnitine et de méthylcitrate (Quadros, Nakayama, et Sequeira 2013). L'acidémie méthylmalonique modérée et l'absence de phénotype clinique précoce dans ces cas sont probablement dues au fait que le défaut produit une déficience intracellulaire légère mais durable en cobalamine. Le taux élevé de vitamine B12 dans le plasma 9 mois après une seule injection de cobalamine atteste également d'un défaut d'absorption cellulaire. Les effets à long terme de cette maladie ne sont pas encore élucidés, mais la déficience en CD230 devrait être envisagée chez les personnes présentant de forts taux d'acide méthylmalonique dans le sang et les urines et qui ne présentent pas d'autres défauts dans le métabolisme de la vitamine B12 (Quadros et al. 2010b) (*Figure 17*).

D. Déficience en haptocorrine

La déficience en haptocorrine est caractérisée par des mutations touchant le gène *TCN1* situé sur le chromosome 11 en position q11-q12 codant pour l'haptocorrine, le transporteur de la vitamine B12 présent dans la salive et l'estomac. L'haptocorrine est une glycoprotéine de 433 acides aminés produite par les glandes salivaires dont le rôle et la fonction physiologique ne sont pas totalement élucidés (Carmel, Parker, et Kelman 2009). La maladie se manifeste par une diminution des taux sériques en vitamine B12 mais sans signe clinique spécifique d'une carence en cobalamine (Martina Huemer et Baumgartner 2019).

Une étude de 2003 a mis en évidence un faible taux de vitamine B12 sérique inexplicé chez 15 % des cas de déficience en haptocorrine alors que dans d'autres cas, le taux sérique est normal (Carmel 2003). A la suite de cette étude, l'équipe a poursuivi ses investigations et a montré que les patients possédant le gène *TCN1* muté de manière homozygote présentaient un faible taux de cobalamine alors que les patients hétérozygotes présentent un taux légèrement faible ou normal (Carmel, Parker, et Kelman 2009). Le fait que ces défauts se

caractérisent par des diminutions des concentrations plasmatiques en vitamine B12 sans d'autres symptômes reflète probablement la présence de niveau normaux du complexe TC/cobalamine qui est la forme requise pour l'absorption de la vitamine B12 par les cellules périphériques (David Watkins et Rosenblatt 2011a) (*Figure 17*).

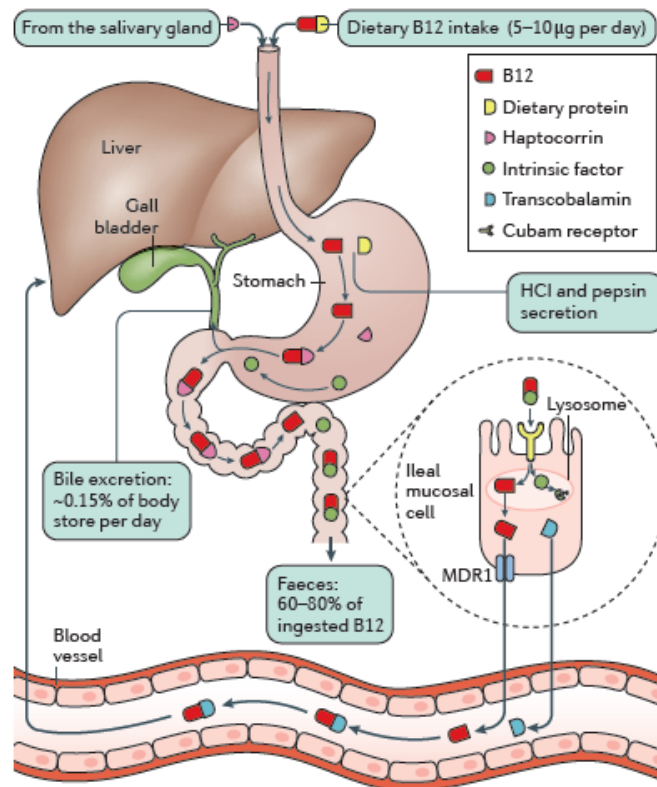


Figure 17 : Absorption et transport de la vitamine B12 et les défauts génétiques pouvant affecter ces voies.

(Green et al. 2017b)

II. Les défauts génétiques affectant le métabolisme intracellulaire et groupes de complémentation associés

Les défauts génétiques ou erreurs innées du métabolisme intracellulaire de la vitamine B12 sont des maladies rares héréditaires multi-systémiques. Ils sont associés à des mutations de gènes codants des enzymes ou des protéines impliquées dans la synthèse et le transport intracellulaire de cofacteurs dérivés de la vitamine B12 (David Watkins et Rosenblatt 2011a) (*Figure 18*). Les conséquences biochimiques ainsi que la symptomatologie et l'âge d'apparition de la maladie sont variables d'un défaut génétique à un autre et donc d'une protéine mutée à une autre en fonction de sa fonction dans le métabolisme.

Le diagnostic de ces défauts génétiques du métabolisme intracellulaire de la cobalamine repose sur des données génétiques pour connaître l'emplacement de la mutation ainsi que le gène touché mais aussi sur des paramètres biochimiques et moléculaires. Outre l'analyse

généétique, des tests enzymatiques ou d'incorporation de radioéléments étaient utilisés en routine sur des fibroblastes de patients (David Watkins et Rosenblatt 2011b).

L'étendue considérable de l'hétérogénéité clinique et biochimique observée chez les patients souffrant de troubles du métabolisme de la vitamine B12 a conduit à la nécessité d'identifier ces défauts et de classer les patients en groupes définis. La question est de répertorier les formes sévères ou légères de la maladie ainsi que leur réponse ou non à la vitamine B12 pouvant être expliquées par des mutations dans des gènes différents. Cette étude a été réalisée dans des hétérocaryons (cellules multinucléées produites par fusion de fibroblastes de différents patients) afin d'identifier les défauts spécifiques. Pour examiner la complémentation, les hétérocaryons sont soumis à des tests fonctionnels basés sur l'incorporation de propionate, de méthyltétrahydrofolate ou de formate radiomarqués au ^{14}C afin de mesurer la méthionine par comptage de la radioactivité après isolement des cobalamines et séparation des fractions par chromatographie liquide haute performance (HPLC). Dans un premier temps, 4 groupes de complémentations distincts ont été identifiés : cblA, cblB, cblC et mut. Ensuite, 5 groupes supplémentaires ont été décrits : cblD, cblE, cblF, cblJ et cblG. Ces 8 groupes présentent des blocages dans la production ou l'utilisation de MeCbl, d'AdoCbl ou dans les deux. Bien que tous les gènes correspondant à ces troubles aient été décrits, nombre de leurs fonctions restent obscures (Froese et Gravel 2010). Quelques années plus tard un neuvième groupe de complémentation a été décrit (cblX) caractérisé par des mutations du gène *HCFC1* jouant un rôle dans la régulation de l'expression de nombreux gènes dont *MMACHC* (David Watkins et Rosenblatt 2016) (*Figure 18*).

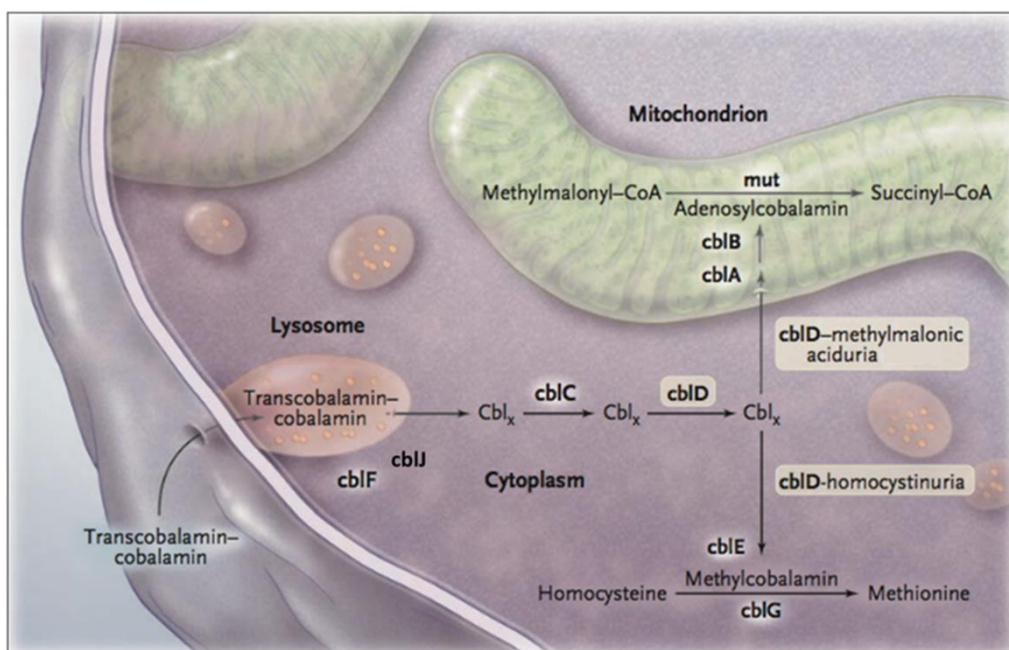


Figure 18 : Métabolisme intracellulaire de la vitamine B12 et les défauts génétiques associés.

A ce jour, 9 groupes de complémentation ont été mis en évidence : les groupes cblA, cblB et mut impactent la voie mitochondriale ; les groupes cblE et cblG impactent la voie cytoplasmique et les groupes cblF, cblJ, cblC, cblD, cblH et cblX impactent les deux voies.

(Coelho et al. 2008a)

A. Défauts génétiques affectant le transport intracellulaire

Les défauts *cbIF* et *cbIJ*

Comme mentionné précédemment, après avoir été acheminée par le tube digestif puis être passée dans le sang couplée à diverses protéines, la vitamine B12 pénètre dans les cellules liées à la transcobalamine (TC) par son récepteur CD320. Le complexe va être endocytosé et l'endosome se transformera en lysosome afin de la découpler de la TC. La vitamine B12 libre pourra ensuite quitter les lysosomes via la protéine LMBD1 et le transporteur ABCD4 (Kitai et al. 2021).

Les groupes de complémentation *cbIF* et *cbIJ* sont caractérisés par des mutations induites dans les gènes *LMBRD1* et *ABCD4* respectivement. Le gène *LMBRD1* se situe sur le chromosome 6 en position q13 et code pour une protéine membranaire à 9 domaines transmembranaires des lysosomes (D. Watkins et Rosenblatt 1986). Le gène *LMBRD1* partage une homologie avec la famille des protéines membranaires internalisant les lipocalines qui sont des petites molécules hydrophobes comme les stéroïdes et les lipides. Il a été suggéré que les molécules « lipocalin-like » seraient capables de lier la vitamine B12 dans les lysosomes et de réaliser la dégradation de la TC. Seuls 113 patients ont été décrits et 6 mutations ont été identifiées (Froese et Gravel 2010) (Altawil et al. 2020) (Figure 19).

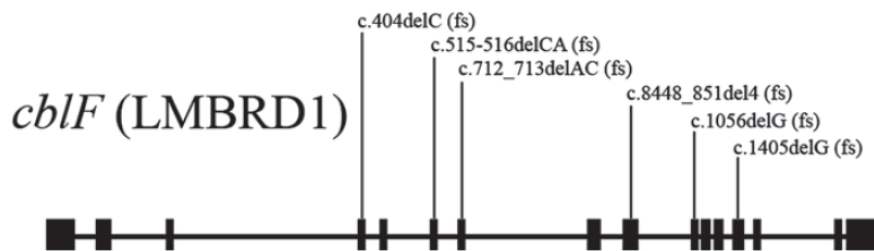


Figure 19 : Mutations identifiées du gène *LMBRD1* dans le défaut *cbIF*.

(Froese et Gravel 2010)

Le gène *ABCD4* se situe sur le chromosome 14 en position q24.3 et code pour un transporteur de type ABC possédant une activité ATPase. *ABCD4* est aussi connu sous les noms P70R et PMP69 et a initialement été décrit comme un membre de la sous famille D des transporteurs ABC. Cette protéine possède un domaine membranaire et un transporteur ABC ou domaine de liaison aux nucléotides (NBD) caractérisé par des motifs hautement conservés impliqués dans la liaison à l'ATP et au Mg^{2+} (signature ABC et motifs Walker A et B) (Coelho et al. 2012) (Figure 20).

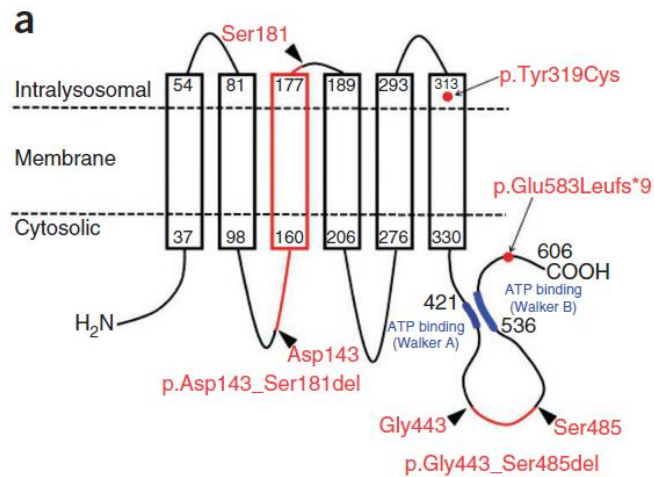


Figure 20 : Représentation schématique du transporteur ABCD4 et des mutations possibles.

Le site putatif de liaison à l'ATP qui contient des séquences consensus de Walker A et B apparaît en bleu ; les différentes mutations répertoriées de ABCD4 sont mentionnées en rouge. Les positions transmembranaires ont été prédites par le programme PHDhtm à la suite de PredictProtein11.

(Coelho et al. 2012)

ABCD4 et LMBD1 sont donc deux protéines transmembranaires lysosomales formant un complexe qui permet la translocation de la vitamine B12 des lysosomes vers le cytoplasme. En cas de mutations dans l'un des deux gènes codant ces protéines, le complexe est perturbé et la vitamine B12 ne peut sortir des lysosomes. Ces deux pathologies apparaissent lors de la première année de vie et les patients présentent une hyperhomocystéinémie ainsi qu'une acidémie méthylmalonique (Martina Huemer et al. 2017a). Les conséquences physiologiques pour les patients sont très variables et sont caractérisés par des symptômes hématologiques de type anémie mégaloblastique, suppression de la moelle osseuse, malformations cardiaques mais aussi des symptômes neurologiques comme des retards de croissance, une hypotonie, une léthargie et des difficultés de prises alimentaires. Chez les patients cblF il est en plus décrit des malformations congénitales ainsi qu'une hyperpigmentation de la peau. Chez les patients cblJ on retrouve plutôt une hypopigmentation des cheveux ce qui fait de ce symptôme une caractéristique clé de ce défaut génétique (Martina Huemer et Baumgartner 2019).

Les défauts cblC, cblX et cblD

A sa sortie des lysosomes via LMBD1 et ABCD4, la vitamine B12 est prise en charge par deux nouvelles protéines qui sont MMACHC et MMADHC.

Le défaut cbID est caractérisé par des mutations dans le gène *MMADHC* localisé sur le chromosome 2 en position q23.2. Il s'agit d'un défaut très rare ayant été décrit pour la première fois en 1970 où deux frères ont été diagnostiqués (Goodman et al. 1970). Depuis, on compte environ 18 cas rapportés dans le monde. Les patients présentent une forte hétérogénéité dans la présentation des symptômes ainsi que dans les paramètres physiologiques ce qui a amené à une sous-classification de 3 phénotypes biochimiques (*Figure 21*).

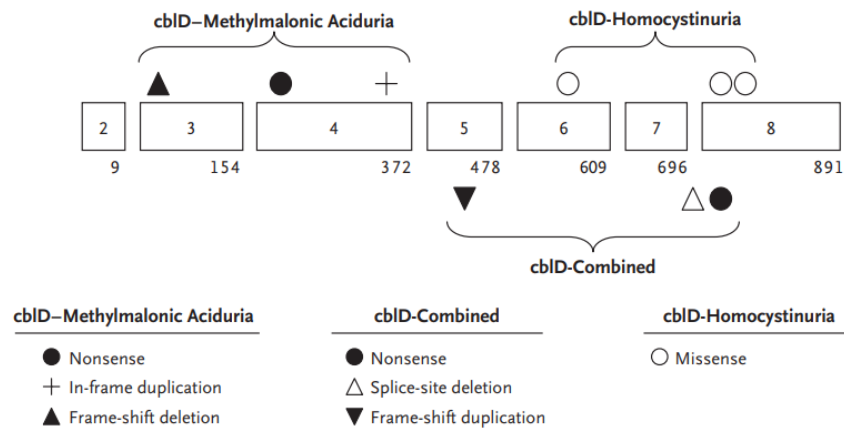


Figure 21 : Localisation, organisation structurale et mutations du gène *MMADHC*.

Position des mutations répertoriées sous le groupe de complémentation cbID. Les exons sont représentés par les cases numérotées et les chiffres sous les cases indiquent la position dans la séquence de l'ADN du dernier nucléotide de chaque exon.

(Coelho et al. 2008b)

La forme classique aussi nommée cbID-MMA/HC se caractérise par une hyperhomocystéinémie couplée à une acidémie méthylmalonique causées par des mutations faux-sens délétères en aval de la méthionine 116 (Coelho et al. 2008a). La seconde forme connue est cbID-HC qui se caractérise par une hyperhomocystéinémie isolée due à un déficit en MeCbl, le cofacteur de la MS. Cela est causé par des mutations faux-sens induisant des substitutions d'acides aminés dans la partie C-terminale de l'enzyme. Enfin, la dernière forme est cbID-MMA qui se caractérise par une acidémie méthylmalonique isolée causée par un déficit en AdoCbl, le cofacteur de la MMAA, induit par un arrêt prématuré de la traduction en N-terminal et une réinitialisation de la traduction en position 62 ou en position 116. Les manifestations cliniques varient en fonction du sous-groupe cbID (Suormala et al. 2004). Les patients cbID-MMA/HC présentent des troubles neurologiques (psychoses, convulsions, retard mental) couplés à une anémie mégaloblastique. Les patients cbID-HC sont plutôt caractérisés par un retard de développement, une dystonie, des convulsions, un nystagmus et une anémie mégaloblastique alors que les cbID-MMA présentent habituellement une détresse respiratoire, un coma cétonique sévère, des entérocolites nécrotiques, une naissance prématurée, mais sans anémie mégaloblastique (Coelho et al. 2008b).

Le défaut cblC est le défaut le plus fréquent des défauts génétiques affectant le métabolisme intracellulaire de la vitamine B12 en touchant plus de 500 patients dans le monde (Lerner-Ellis et al. 2006). Ce défaut est dû à des mutations dans le gène *MMACHC* situé sur le chromosome 1 en position p34.1. Aujourd'hui plus de 70 mutations de ce gène ont été identifiées. Les études menées sur des populations européennes ont mis en évidence la mutation la plus fréquente : c.271dupA qui est retrouvée dans 42% des allèles pathogéniques. Dans d'autres populations, c'est un autre type de mutation qui est fréquent comme c.609G>A retrouvé dans les populations chinoises par exemple. Il a été montré que le phénotype était hautement corrélé au génotype de mutation (*Figure 22*). En effet, la mutation c.270dupA est corrélée avec un phénotype précoce de la maladie et des symptômes sévères alors que la mutation c.394C>T est plutôt associée à un phénotype tardif présentant des symptômes moins importants et est retrouvée dans 20% des cas (David Watkins et Rosenblatt 2011b). Enfin, la dernière mutation fréquente est c.331C>T retrouvée dans 5% des allèles pathogéniques (Froese et Gravel 2010). Le défaut génétique cblC est le premier groupe de complémentation identifié correspondant à des problèmes de production d'AdoCbl et de MeCbl (David Watkins et Rosenblatt 2011a). Tous les patients cblC présentent une hyperhomocystéinémie combinée à une acidémie méthylmalonique et souffrent souvent en plus de problèmes hématologiques, neurologiques, ophtalmologiques à des degrés différents en fonction de l'âge d'apparition des symptômes et de la sévérité de ces derniers (Bacci et al. 2017). Les manifestations les plus communes incluent l'anémie mégaloblastique, une détérioration neurologique aigue, une hydrocéphalie, une démyélinisation, une confusion, un retard mental, une cardiomyopathie avec décompensation, une hypertension pulmonaire, une rétinopathie, un syndrome hémolytique urémique et une stéatose hépatique. L'ataxie, les neuropathies périphériques et les manifestations thromboemboliques deviennent plus fréquentes plus tard dans la vie alors qu'une décompensation sévère et parfois mortelle a été observée dans plusieurs cas au cours de la première année de vie (Wiedemann et al. 2024).

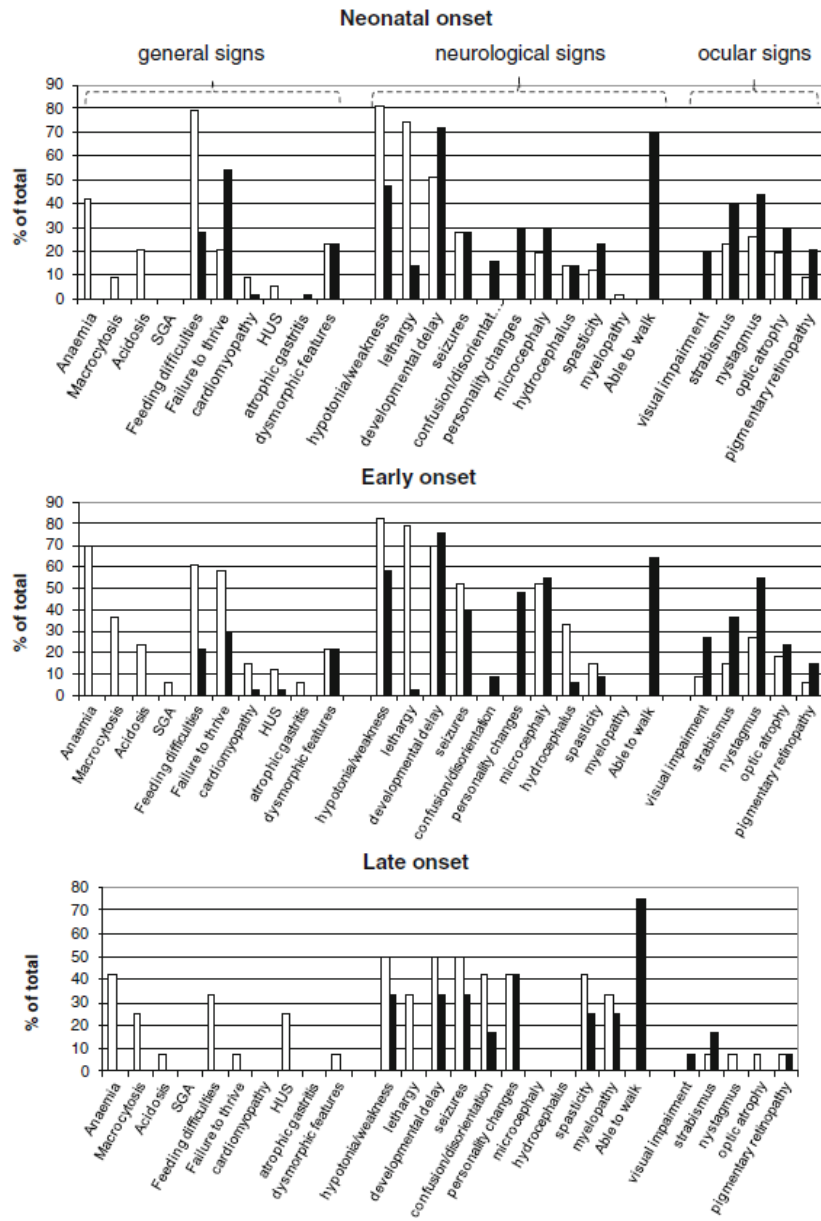


Figure 23 : Symptômes généraux, neurologiques et ophtalmologiques observés chez des patients cblC.

Les barres claires représentent le pourcentage de patients présentant les différents symptômes au début de la maladie et les barres noires au cours de l'évolution de la maladie cblC. Abréviations : SGA, petit pour l'âge gestationnel ; HUS, urémique hémolytique.

(Fischer et al. 2014)

Récemment, une nouvelle étude a mis en évidence un autre type de mutation touchant un seul allèle du gène *MMACHC* avec l'autre allèle subissant une épimutation produite par une mutation du gène adjacent *PRDX1*. Cette épimutation est responsable du défaut epiCbIC (J.-L. Guéant et al. 2018) (*Figure 24*).

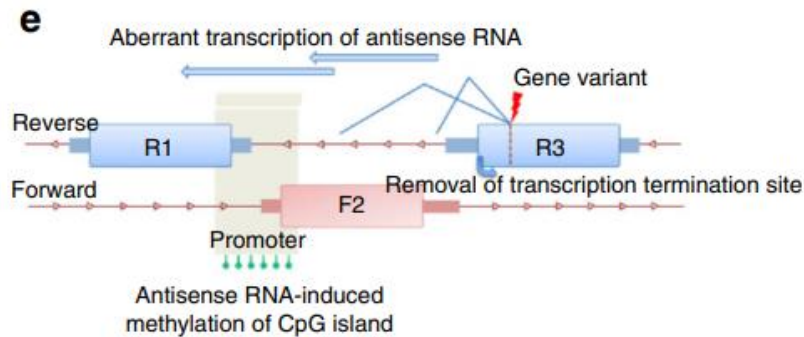


Figure 24 : Epimutation de MMACHC causé par une mutation de PRDX1.

Proposition du mécanisme d'épimutation silencieuse de l'allèle F2 non-muté dans un patient avec une mutation hétérozygote d'un gène causal appartenant à un trio de gènes. R1, reverse ; R2, forward ; R3, reverse.

(J.-L. Guéant et al. 2018)

Il y a une dizaine d'année un dernier groupe de complémentation a été mis en évidence par l'équipe de Yu en 2013. Il s'agit du défaut *cbIX* caractérisé par des mutations dans le gène *HCFC1* (host cell factor C1) (H.-C. Yu et al. 2013). Ce défaut a été mis en évidence suite à l'étude de 18 patients classés initialement dans le groupe *cbIC*. Ils présentaient des symptômes caractéristiques des *cbIC* mais ne présentaient aucune mutation du gène *MMACHC*. Suite à un séquençage de l'exome de ces patients, différentes mutations de types faux-sens ont été détectées dans le gène *HCFC1* localisé sur le chromosome X. Ce gène code pour un régulateur transcriptionnel de nombreux gènes dont *MMACHC* et est impliqué dans divers processus biologiques tels que la prolifération, la migration ou encore la mort cellulaire (H. Yu et al. 2010). La régulation transcriptionnelle se produit grâce à des motifs de liaison permettant à la protéine *HCFC1* de se lier à deux autres co-régulateurs qui sont *THAP11* (THAP domain containing 11 aussi connu sous le nom de *RONIN*) et *ZNF143* (protéine à doigt de zinc 143) (Quintana et al. 2017) (Pupavac et al. 2016). Cet interactome fonctionnel permet la régulation transcriptionnelle de *MMACHC* en se liant sur son promoteur. La liaison de *HCFC1* à ces deux autres protéines est indispensable pour la régulation de l'expression génique car *HCFC1* ne possède pas de domaine de liaison à l'ADN. D'autres gènes sont régulés de cette manière comme *MTR*, *ABCD4* ou encore *SUCLG1* suggérant donc que ce mécanisme est hautement important pour la régulation de l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme intracellulaire de la vitamine B12 et dans le cycle de Krebs (H.-C. Yu et al. 2013). Le défaut *cbIX* n'est pas uniquement caractérisé par des mutations dans le gène *HCFC1* mais est aussi caractérisé par des mutations des gènes *THAP11* et *ZNF143*. En effet, en cas de mutations de ce derniers, *HCFC1* ne peut se lier à l'ADN ce qui aboutit à une modification de l'expression de *MMACHC* et donc au défaut *cbIX*. Des mutations dans ces 2 autres gènes seront donc apparentées à des défauts de types *cbIX*-like. Des modèles de KO pour *HCFC1* ou *THAP11* ont

mis en évidence des problèmes de développement crâniofaciaux suggérant que HCFC1 et THAP11 sont aussi impliqués dans le développement tissulaire (Quintana et al. 2017).

Défauts génétiques affectant la voie mitochondriale : les défauts cblA, cblB et mut

Le défaut cblA est caractérisé par des mutations dans le gène *MMAA* localisé sur le chromosome 4 en position q31.1-31.2 codant pour la protéine MMAA (methylmalonyl acidemia linked to the cblA) (Dobson, Wai, Leclerc, Wilson, et al. 2002) . Son orthologue bactérien est la protéine meaB qui joue un rôle apparenté dans le transfert d'AdoCbl de la cobalamine adénosyltransférase à la méthylmalonyl CoA mutase et dans la liaison de l'AdoCbl à la mutase. La mutation la plus courante de ce gène est la mutation c.433C>T qui représente 43% des pathologies cblA identifiées en Amérique du Nord (Figure 25). Une autre mutation, c.503delC est plus fréquente dans les populations japonaises (David Watkins et Rosenblatt 2011b). Le rôle précis du gène *MMAA* n'est pas très bien connu mais suggère un rôle dans le transport mitochondrial et dans la réduction de la cobalamine (Dempsey-Nunez et al. 2012).

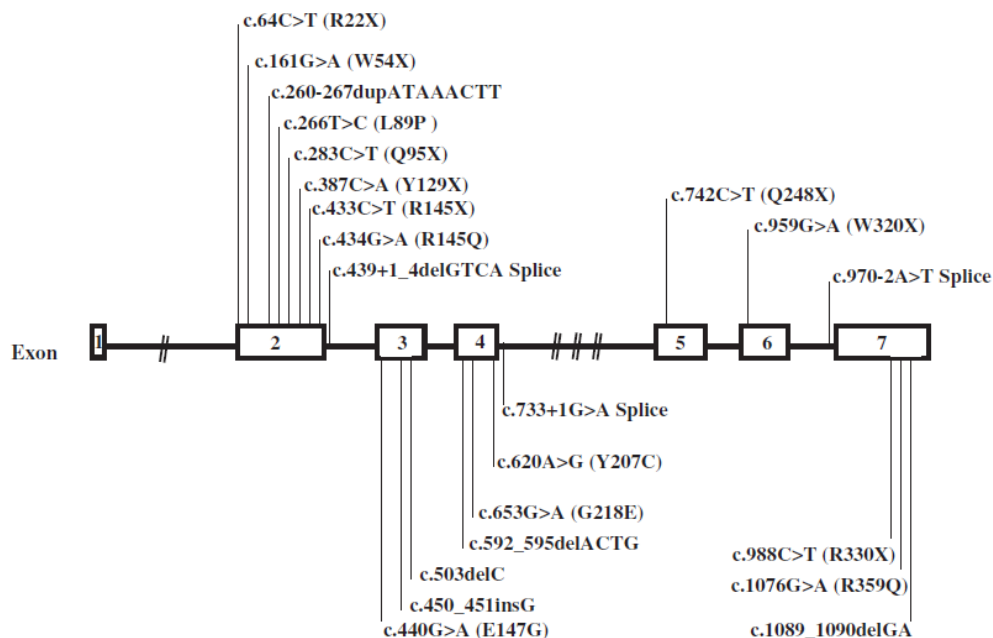


Figure 25 : Structure du gène *MMAA* et positions des différentes mutations identifiées.

(Lerner-Ellis et al. 2004)

Le défaut cblB est caractérisé par des mutations dans le gène *MMAB* localisé sur le chromosome 12 en position q24 codant pour la protéine MMAB (methylmalonyl acidemia linked to the cblB) qui est une adénosyltransférase (Dobson, Wai, Leclerc, Kadir, et al. 2002). De nombreuses mutations ont été mises en évidence affectant le site actif de l'enzyme par cristallographie à rayons X dans des bactéries, des archées mais aussi dans des cellules de mammifères (David Watkins et Rosenblatt 2011b) (Figure 26).

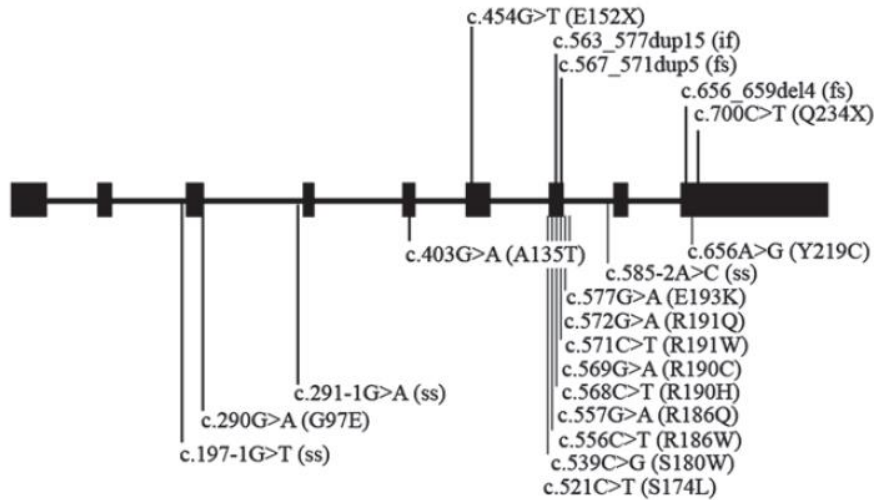


Figure 26 : Représentation schématique du gène *MMAB* et localisation des différentes mutations identifiées.

(Froese et Gravel 2010)

Le défaut mut est caractérisé par des mutations dans le gène *MUT* localisé sur le chromosome 6 en position p12.3 codant pour la méthylmalonyl CoA mutase (MCM) (Ledley et al. 1988). Il s'agit de la cause la plus commune d'acidémie méthylmalonique avec plus de 200 mutations identifiées (David Watkins et Rosenblatt 2011b). Ce défaut se subdivise en 2 sous-défauts : le défaut mut est caractérisé par des mutations impactant de 0,5 à 50 % l'activité enzymatique de la mutase et le défaut mut0 est induit par des mutations provoquant une activité enzymatique indétectable (Ledley et al. 1988) (Figure 27).

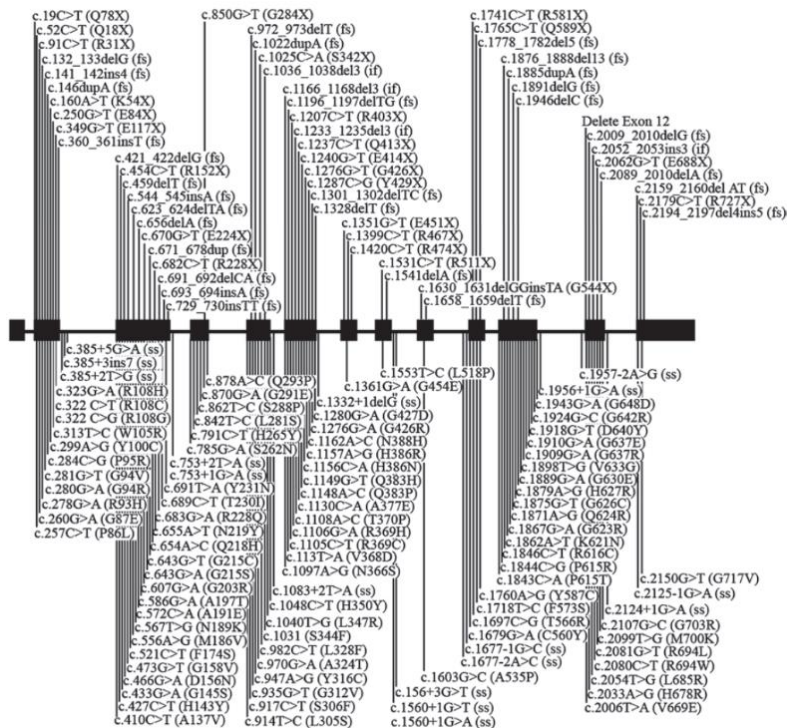


Figure 27 : Représentation schématique du gène *mut* et la localisation des différentes mutations identifiées.

(Froese et Gravel 2010)

Ces trois défauts génétiques affectent la voie mitochondriale du métabolisme intracellulaire de la vitamine B12 en perturbant la synthèse, l'utilisation ou le transport de l'AdoCbl. Ces défauts induisent donc une accumulation d'acide méthylmalonique dans le sang et les urines due à une diminution ou une absence de l'activité enzymatique de la MCM. Les patients atteints de ces pathologies sont uniquement touchés par une acidémie méthylmalonique sans hyperhomocystéinémie. La symptomatologie, varie en fonction des taux d'acide méthylmalonique mesurés et pourra se manifester par des crises d'acidose dès les premières semaines de vie, un retard de croissance et de développement et une encéphalopathie. Si les taux d'acide méthylmalonique deviennent très importants, cela aura pour conséquence des anomalies hématologiques telles que des anémies ou des thrombocytopenies. Ce fort taux d'acide méthylmalonique conduit le plus souvent à des insuffisances rénales au cours de la vie. De plus, il a été mis en évidence que les patients mut ne possédant aucune activité enzymatique résiduelle étaient plus fortement atteints et pouvaient présenter des symptômes neurologiques graves (David Watkins et Rosenblatt 2011b) (Lerner-Ellis et al. 2004).

Défauts génétiques affectant la voie cytoplasmique : les défauts cblG et cblE

Le défaut cblE est caractérisé par des mutations dans le gène *MTRR* localisé sur le chromosome 5 en position p15.31 codant pour la méthionine synthase réductase (MSR). La MSR est pour rappel, responsable de la réduction de la vitamine B12 afin de permettre la réactivation de la MS. Ce défaut génétique a été mis en évidence chez une trentaine de patients et possède une prévalence de 1/1 million. On compte aujourd'hui 19 mutations différentes répertoriées sur le gène *MTRR* avec une mutation retrouvée dans 25% des cas qui est la mutation intronique c.903+469T>C (Ruiz-Mercado et al. 2016) (Figure 28).

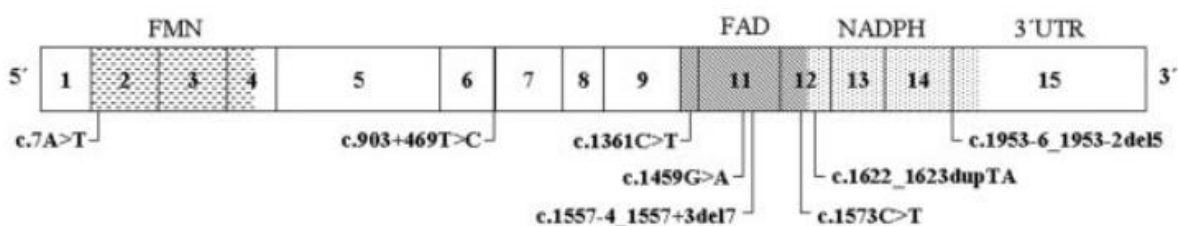


Figure 28 : Représentation schématique du gène *MTRR* et localisation de diverses mutations identifiées.

Les cases blanches représentent les exons. FMN, domaine de liaison au mononucléotide flavine ; FAD, domaine de liaison de l'adénine dinucléotide flavine ; NADPH, domaine de liaison du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate.

(Zavadáková et al. 2005)

Le défaut cblG est caractérisé par des mutations dans le gène *MTR* localisé sur le chromosome 1 en position q43 codant pour la méthionine synthase (MS) (Gulati et al. 1996). On référence actuellement une cinquantaine de cas cblG avec plus de 20 mutations différentes identifiées aboutissant à une diminution de l'activité enzymatique de la méthionine synthase responsable de la synthèse *de novo* de la méthionine (M. Huemer et al. 2015). Les patients cblG peuvent être divisés en deux sous-catégories : les patients présentant une activité résiduelle de la MS

ainsi qu'une présence des deux isoformes de la protéine (cblG) et les patients ne présentant aucune activité de la MS ainsi qu'une absence de l'isoforme active de la MS à 144 kDa (cblG-variant ou cblG*) (Fofou-Caillierez et al. 2013) (*Figure 29*).

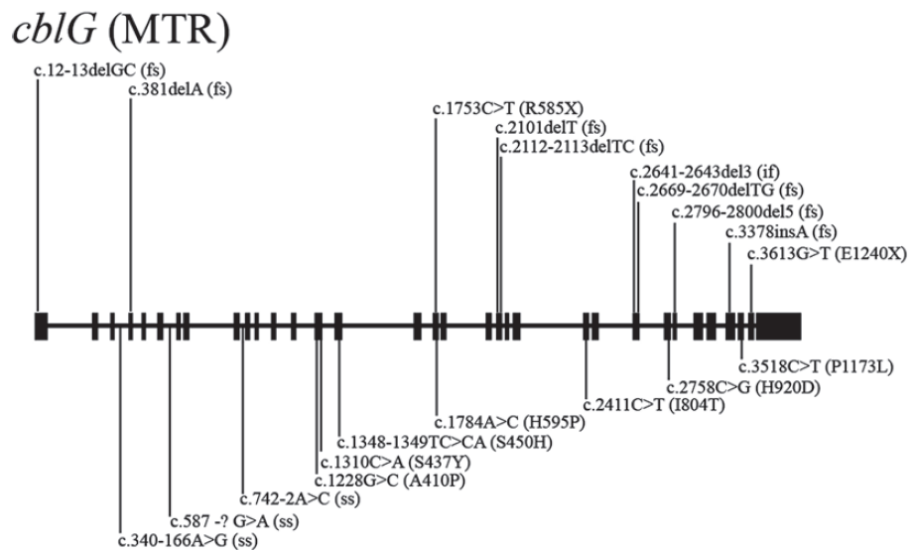


Figure 29 : Représentation schématique du gène MTR et localisation des différentes mutations identifiées.

(Froese et Gravel 2010)

Ces deux défauts génétiques affectent la voie cytoplasmique de reméthylation de l'homocystéine en méthionine. Cela aura donc pour conséquence une hyperhomocystéinémie chez ces patients ainsi qu'une diminution plus ou moins importante de l'activité enzymatique de la MS ou de la MSR. Cette hyperhomocystéinémie aura pour conséquences physiopathologiques le développement d'anémies mégalo-blastiques ou macrocytaires associées à des nombreux symptômes neurologiques comprenant un retard de développement, un retard de croissance, une perturbation de la myélinisation des axones mais aussi des symptômes ophtalmologiques de type nystagmus ou une altération de la vision (Martina Huemer et al. 2017a) (M. Huemer et al. 2015) (David Watkins et Rosenblatt 2011a) (*Figure 30*).

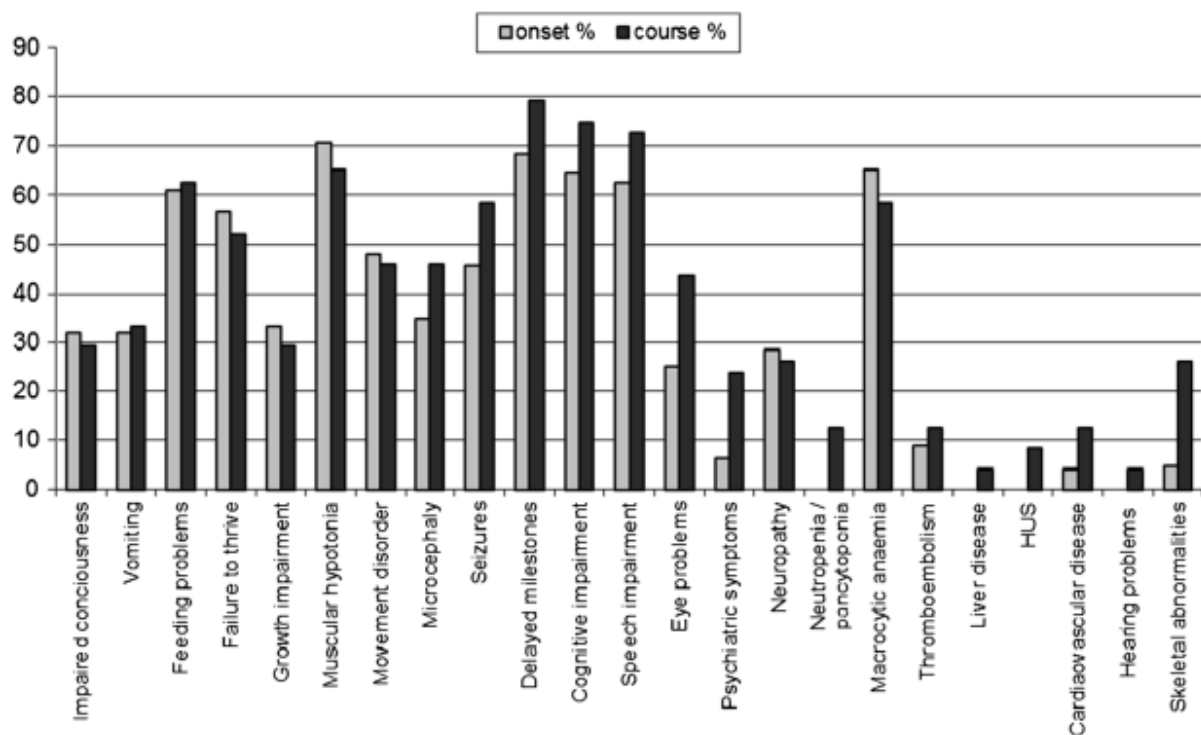


Figure 30 : Principales manifestations cliniques des patients cblE et cblG.

Les barres grises représentent le pourcentage de patients présentant ces symptômes en début de maladie et les barres noires l'évolution de ces symptômes au cours de la maladie.

(M. Huemer et al. 2015)

III. Résumé des conséquences physiopathologiques des défauts génétiques du métabolisme de la vitamine B12 et des traitements utilisés

Comme mentionné tout au long de ce chapitre, les principales conséquences physiologiques des défauts génétiques affectant le métabolisme de la vitamine B12 sont d'ordre hématologique et neurologique. Ces différents symptômes sont retrouvés de manière différente en fonction du type de défaut et présentent une sévérité très variable (Figure 31).

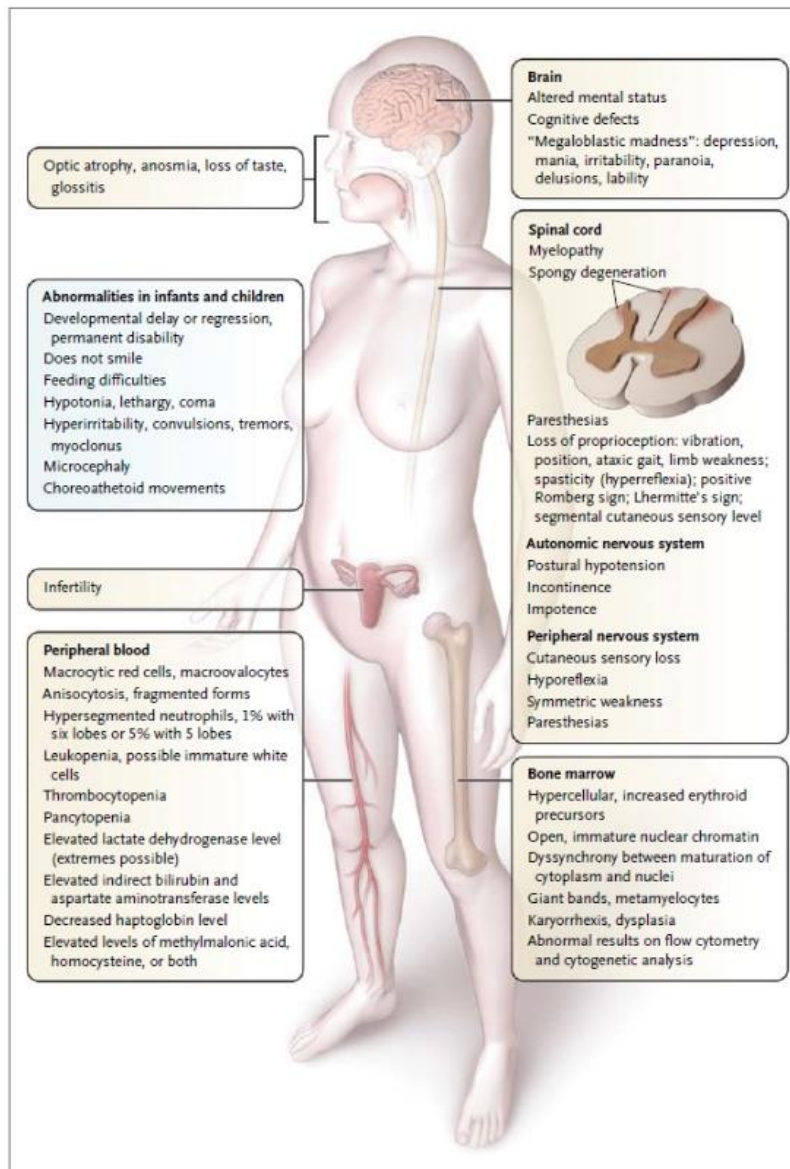


Figure 31 : Principales présentations cliniques de la déficience en vitamine B12.

Le spectre des maladies associées à une carence en vitamine B12 est large, allant de l'asymptomatique aux problèmes hématologiques et neurologiques de divers types.

(Stabler 2013)

Avec un traitement approprié, les troubles de l'absorption et du transport de la vitamine B12 ont un pronostic favorable. Malheureusement les algorithmes de traitement dans la pratique sont très variables, ce qui rend difficile la définition de recommandations thérapeutiques fondées sur des preuves. En général, le traitement classique est basé sur des injections intramusculaires d'OHcbl à 1 mg à vie. Les doses et les intervalles sont définis individuellement. Certains patients ont obtenu une rémission clinique et biochimique complète avec un traitement à 1 mg deux fois par an. D'autres patients répondent plus favorablement à un traitement oral (Martina Huemer et al. 2017a) (David Watkins et Rosenblatt 2011b).

Concernant les troubles de la reméthylation, il est recommandé d'éviter un traitement diététique restreint en protéines car cela peut aggraver la carence en méthionine et donc perturber l'homéostasie des acides aminés. De plus, le protoxyde d'azote, souvent utilisé en anesthésie, est un puissant inhibiteur de la MS, il est donc fortement contre-indiqué chez les patients présentant des troubles de la reméthylation. Pour presque la totalité des défauts génétiques impactant le métabolisme intracellulaire de la vitamine B12, le traitement se définit aussi par des injections intramusculaires d'OH-Cbl ou de CNCbl à différentes doses et à différents intervalles. En plus de ce traitement classique on peut ajouter une administration orale de bétaine ou de carnitine ayant pour effet une augmentation significative des concentrations en méthionine et une diminution de l'homocystéine mais aussi une diminution des concentrations d'acide méthylmalonique (Martina Huemer et al. 2017a).

Ces différents traitements ont un effet bénéfique sur les symptômes hématologiques mais n'ont malheureusement aucun effet sur les symptômes neurologiques et ophtalmologiques, ce qui démontre la nécessité de développer des traitements alternatifs (Martina Huemer et al. 2017a).

Chapitre 4 : Le rôle de la méthylation dans la régulation de l'expression des gènes

I. Généralités

La génétique est l'étude des modifications héréditaires de l'expression des gènes dues à des modifications directes de la séquence nucléotidique de l'ADN. Ces modifications comprennent des mutations ponctuelles, des délétions, des insertions et des translocations. En revanche l'épigénétique est l'étude des changements héréditaires dans l'activité ou la fonction des gènes qui ne sont pas associés à une modification de la séquence. Bien que pratiquement toutes les cellules de l'organisme contiennent la même information génétique, l'expression des gènes n'est pas identique. Les mécanismes épigénétiques sont à l'origine des profils d'expression génique diversifiés dans une variété de cellules et de tissus dans les organismes multicellulaires (Moore, Le, et Fan 2013a).

La méthylation est un processus biochimique induisant un transfert d'un ou plusieurs groupements méthyle ou CH_3 d'une molécule donneuse à une molécule acceptrice. Cette modification chimique est réalisée par des enzymes spécialisées dans ce transfert qui sont les méthyltransférases. Les cibles de la méthylation sont nombreuses et peuvent être des acides nucléiques composants de l'ADN ou de l'ARN, des acides aminés composant diverses protéines, les histones ou encore des lipides. Ces diverses cibles rendent compte d'un processus biologique complexe et hautement régulé pouvant tout de même être touché par des déficits induisant des anomalies de la méthylation et ayant pour conséquences de nombreux types de pathologies.

II. Définition de l'épigénétique

Dans les années 1920, deux scientifiques, Hilde Mangold et Hans Spemann étudiaient l'embryologie via l'étude de la transplantation de blastopores de tritons. Ils ont au fil de leur recherche, introduit le concept clé en embryologie de centre organisateur également connu sous le nom d' « organisateurs de Spemann-Mangold » qui sont caractérisés par des groupes de cellules guidant le destin des cellules environnantes pour former des tissus de plus en plus complexes (Spemann et Mangold 2001). Par la suite, le scientifique britannique Conrad Hal Waddington a étendu ce concept aux mammifères. En 1939, il utilise pour la première fois le terme « d'épigénotype » pour décrire « les relations d'organisation auxquelles un certain morceau de tissu sera soumis au cours du développement » et par conséquent, il définit un ensemble de processus de développement reliant le génotype au phénotype. Waddington propose alors d'intégrer cette nouvelle discipline à la biologie afin d'étudier les interactions causales entre les gènes et leurs produits qui donnent naissance au phénotype (Waddington 1968). En 1941, les scientifiques George Beadle et Edward Tatum développent l'hypothèse « un gène – une enzyme » qui décrit le flux initial de l'information génétique vers un produit protéique (Beadle et Tatum 1941). En 1953, James Watson et Francis Crick développent

l'hypothèse de l'enzyme unique et résolvent la structure de la double hélice de l'ADN. Par conséquent dans les années 1950, l'ADN est considéré comme une structure double hélicoïdale répliquative nécessaire à la fabrication des enzymes. Le fossé entre le génotype et le phénotype se réduit, et petit à petit, émergent les premiers systèmes complexes de la régulation de l'expression des gènes (Watson et Crick 1953). En 1958, le généticien David Nanney met en évidence au cours de son étude sur l'existence, de différences phénotypiques entre des cellules ayant le même génotype, indiquant donc des spécificités exprimées non entièrement déterminées par l'ADN des cellules. Il émet donc l'hypothèse que d'autres dispositifs des systèmes épigénétiques régulent l'expression des « potentialités génétiquement déterminées » (Nanney 1958). Dans les mêmes moments, Waddington évoque un « paysage épigénétique » en décrivant la restriction du potentiel de développement au fil du temps comme une boule roulant vers le bas à travers des vallées de plus en plus étroites et distinctes (Waddington 1968). Nanney et Waddington produisent donc des définitions de l'épigénétique complémentaires selon lesquels les spécificités génétiques sont régulées par des facteurs cellulaires qui déterminent les potentialités qui se manifestent au cours du développement.

Au fil des années, l'épigénétique a été utilisée pour décrire à la fois les facteurs environnementaux qui modifient le phénotype à travers les populations et le temps et les facteurs cellulaires qui contrôlent l'expression des gènes au cours des cycles de réplication (Tompkins 2022).

III. Les cibles de la méthylation

A. La méthylation de l'ADN

Un des mécanismes de régulation épigénétique le plus important de l'organisme implique une modification chimique directe de l'ADN aussi connue sous le nom de méthylation de l'ADN. Historiquement, la méthylation de l'ADN a été mise en évidence chez les mammifères par Avery en 1944 peu de temps après l'identification de l'ADN comme matériel génétique (Avery, Macleod, et McCarty 1944). En 1948, Rollin Hotchkiss découvre une cytosine modifiée dans une préparation de thymus de veau par chromatographie sur papier. Il émet alors l'hypothèse qu'il s'agit d'une 5-méthylcytosine (5mC) car elle se sépare de la cytosine de la même manière que la thymine, aussi connue sous le nom de méthyluracile, se sépare de l'uracile (Hotchkiss 1948). Bien que de nombreux chercheurs aient proposé que la méthylation de l'ADN puisse réguler l'expression des gènes, ce n'est qu'en 1980 que plusieurs études ont démontré que la méthylation de l'ADN était impliquée dans la régulation de l'expression génique et dans la différenciation cellulaire (Holliday et Pugh 1975). Il est bien connu maintenant que la méthylation de l'ADN, de concert avec d'autres régulateurs, est un facteur épigénétique majeur influençant l'expression des gènes (Moore, Le, et Fan 2013a).

La méthylation de l'ADN est réalisée par des enzymes spécifiques nommées ADN méthyltransférases (DNMT : DNA nucleotide methyltransferase) réalisant le transfert du groupement méthyle de la SAM sur le 5^{ème} carbone d'un résidu cytosine de l'ADN pour former de la 5mC. On retrouve quatre types différents de DNMT chez les mammifères : DNMT1, DNMT3a, DNMT3b et DNMT3L toutes partageant une forte homologie de structure (*Figure 32*). En effet, ces quatre types d'enzymes possèdent tous un domaine C-terminal possédant l'activité catalytique de la méthyltransférase et un domaine N-terminal possédant l'activité régulatrice. C'est ce domaine régulateur qui est différent d'une DNMT à une autre (Jurkowska, Jurkowski, et Jeltsch 2011).

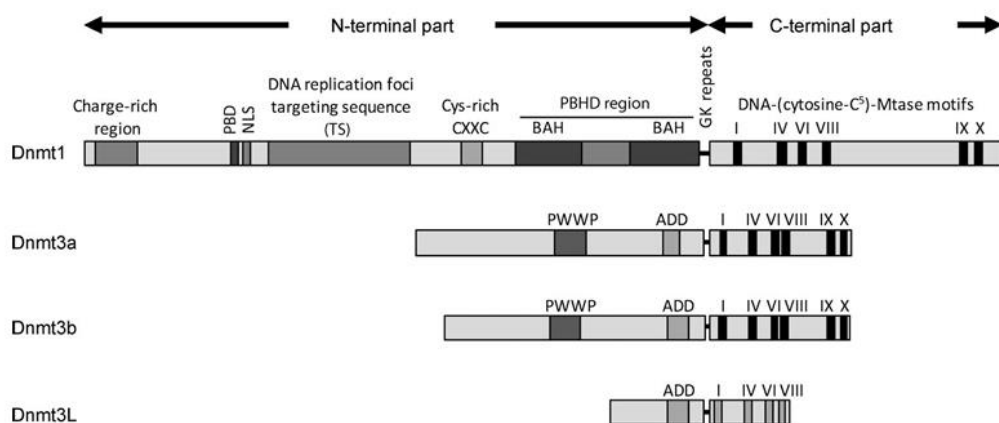


Figure 32 : Architecture des domaines composant les différentes méthyltransférases de l'ADN.

Abréviations : PBD, *proliferating cell nuclear antigen binding domain* ; NLS, *séquence d'import nucléaire* ; TS ; *séquence cible* ; CXXC, *domaine zinc ou domaine riche en cystéine* ; BAH, *bromo-adjacent homology* ; PBHD, *polybromo homology domain* ; GK repeat, *répétions de lysine et glycine* ; ADD, *ATRX-DNMT3-DNMT3L ou région riche en cystéines* ; PWWP, *motif proline-tryptophane conservé*.

(Jurkowska, Jurkowski, et Jeltsch 2011)

Bien que la méthylation soit un processus très fréquent sur l'ADN, la 5-méthylcytosine ne représente que 1% des acides nucléiques du génome humain (Moore, Le, et Fan 2013a). La majorité des méthylations de l'ADN se produit sur les cytosines qui précèdent une guanine plus communément nommé îlot CpG (cytosine point guanine). Ces îlots sont le plus souvent retrouvés dans la région 5' des gènes et représentent environ 60% des promoteurs. Cependant, la grande partie des génomes des mammifères possèdent des îlots CpG hypométhylés afin de maintenir la stabilité du génome. En effet, la 5mC peut se désaminer en thymine et donc induire des mutations (Coulondre et al. 1978). La méthylation de l'ADN est essentielle au « silencing » d'éléments rétroviraux, à la régulation de l'expression des gènes spécifiques à des tissus, à l'empreinte génomique et à l'inactivation du chromosome X (E. Li et Zhang 2014). Il est important de noter que la méthylation de l'ADN dans différentes régions génomiques peut exercer des influences différentes sur l'activité des gènes en fonction de la séquence génétique sous-jacente (Moore, Le, et Fan 2013a).

DNMT1 fut la première DNMT clonée et caractérisée biochimiquement (Bestor et al. 1988). DNMT1 présente une préférence pour l'ADN hémi-méthylé par rapport à l'ADN non-méthylé

et est retrouvée localisée au niveau des foyers de réplication de l'ADN pendant la phase S du cycle cellulaire. Ces propriétés concordent parfaitement avec son rôle principal de méthyltransférase de maintien responsable de la préservation des schémas de méthylation pendant les divisions cellulaires par méthylation des dinucléotides CG hémi-méthylés produits par réplication de l'ADN (Jurkowska, Jurkowski, et Jeltsch 2011) (*Figure 33*).

La famille DNMT3 des méthyltransférases de l'ADN des mammifères comprend trois membres : DNMT3a, DNMT3b et DNMT3L. DNMT3a et 3b sont des méthyltransférases actives responsables de l'établissement des schémas de méthylation de l'ADN au début du développement des mammifères et dans les cellules germinales. DNMT3L est catalytiquement inactive et fonctionne comme un facteur de régulation dans les cellules germinales. Les DNMT3a et DNMT3b ont été traditionnellement désignées comme des méthyltransférases *de novo* de l'ADN hémi-méthylé et de l'ADN non méthylé mais elles jouent aussi un rôle dans le maintien de la méthylation dans les régions hétérochromatiques (Jurkowska, Jurkowski, et Jeltsch 2011). La manière dont les DNMT3 ciblent les régions spécifiques du génome n'est pas encore claire. DNMT3a et DNMT3b peuvent se lier à l'ADN par l'intermédiaire d'un domaine PWWP (motif conservé proline – tryptophane – tryptophane – proline) conservé, cependant on ne sait pas comment elles ciblent spécifiquement les régions (E. Li et Zhang 2014). Une hypothèse suggère des mécanismes d'interférence ARN ciblant les DNMT pour « silencer » des séquences spécifiques. Bien que le mécanisme d'ARN interférent soit impliqué dans la méthylation de l'ADN des cellules végétales, les preuves sont très faibles quant au rôle de ce processus dans les cellules de mammifères. L'autre théorie est que des facteurs de transcription régulent la méthylation *de novo* en se liant à des séquences spécifiques et en recrutant les DNMT. De plus, ces facteurs peuvent permettre la transcription ou alors la réprimer. Il est possible aussi que ces facteurs contribuent à la protection des îlots CpG de la méthylation *de novo* (Moore, Le, et Fan 2013a) (*Figure 33*).

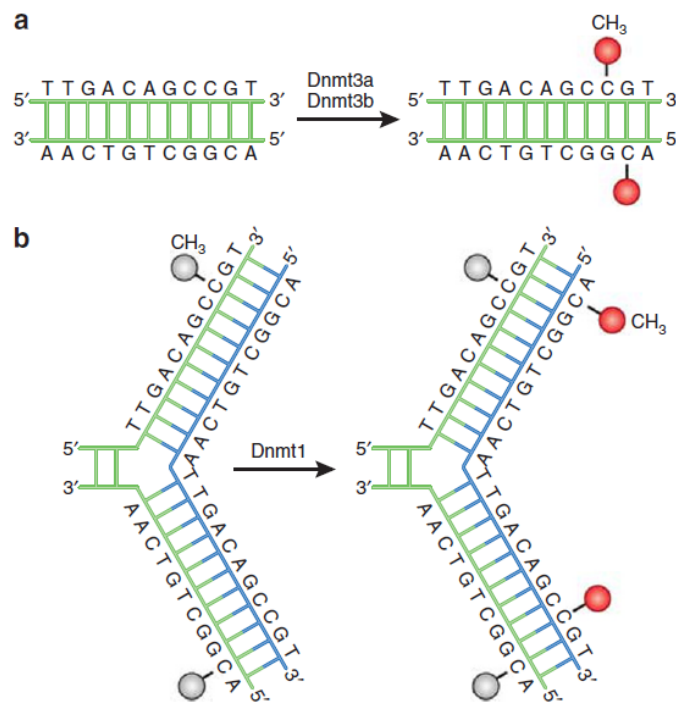


Figure 33 : Les méthyltransférases responsables de la méthylation de l'ADN et leurs mécanismes de fonctionnement.

DNMT3a et DNMT3b sont responsables de la méthylation de novo et DNMT1 de la maintenance de la méthylation. Lorsque l'ADN subit une réplication semi-conservative, le support parental conserve le schéma de méthylation de l'ADN d'origine (en gris). DNMT1 s'associe aux foyers de réplication et réplique précisément le schéma de méthylation original de l'ADN en ajoutant des groupements méthyles (en rouge) sur le brin fille nouvellement formé (en bleu).

(Moore, Le, et Fan 2013a)

B. La méthylation de l'ARN

Comme décrit par Francis Crick en 1970, l'ARN est le seul produit direct de l'ADN qui est ensuite exporté du noyau vers le cytoplasme où il sera traduit en protéines. L'ARN est également connu pour être un acteur clé de la transcription, de la traduction et de la prise de décision cellulaire sous forme d'ARN non codant tels que les ARN ribosomiques (ARNr), les ARN de transfert (ARNt), les microARN ou encore les long ARN non-codants. Au cours du cycle cellulaire et de la vie de l'organisme, l'activité, l'expression et la fonction des gènes peuvent être régulées non seulement par des modifications des séquences d'ARN mais aussi par des modifications épigénétiques affectant l'ARN (Liu et al. 2022). On retrouve des modifications chimiques dans presque tous les types d'ARN ce qui rajoute une complexité supplémentaire à l'information véhiculée par ce dernier. Ces modifications influencent la structure de l'ARN et son interaction avec d'autres molécules donnant lieu aux diverses fonctions des ARN en particulier au sein de réseaux de régulation complexe comme l'épissage, l'efficacité de la traduction ou le traitement des pré-microARN (L.-Y. Zhao et al. 2020).

Les modifications de l'ARN se produisent chez les eucaryotes, les bactéries et les archées, ce qui indique la conservation et l'importance de ces modifications. Jusqu'à présent, plus de 160 modifications de l'ARN ont été rapportées. Parmi cette multitude de modifications, la méthylation et plus particulièrement, la m6A, une forme de méthylation en position N6 de

l'adénosine sur l'ARNm est la plus étudiée. Elle a été découverte dans les années 1970 par diverses équipes (Desrosiers, Friderici, et Rottman 1974). Cependant, son importance fonctionnelle et les enzymes associées sont restées mystérieuses pendant des décennies en raison des difficultés rencontrées dans la manipulation de l'ARN *in cellulo* (Dubin et Taylor 1975). En effet, m6A représente plus de 80% des résidus méthylés de l'ARN, et est présente dans environ 1 résidu sur 2 000 et plus spécifiquement dans les sites consensus conservés G/A, G/A, A, CA/C/U (Peixoto et al. 2020). Avec une meilleure compréhension de l'importance fonctionnelle de cette modification, l'identification de la m6A méthyltransférase methyltransferase-like-3 en 1997 puis un second membre en 2014 (complexe METTL3/METTL14), de la déméthylase (FTO et ALKBH5), et le développement du séquençage de nouvelle génération, le paysage de la méthylation m6A dans le transcriptome est maintenant un peu mieux compris. La méthyltransférase METTL3 contient un site de liaison à la SAM et un site catalytique appelé domaine CMII. La méthylation m6A fait donc intervenir diverses protéines appelées « m6A writers », « m6A readers » et « m6A erasers » (Figure 34).

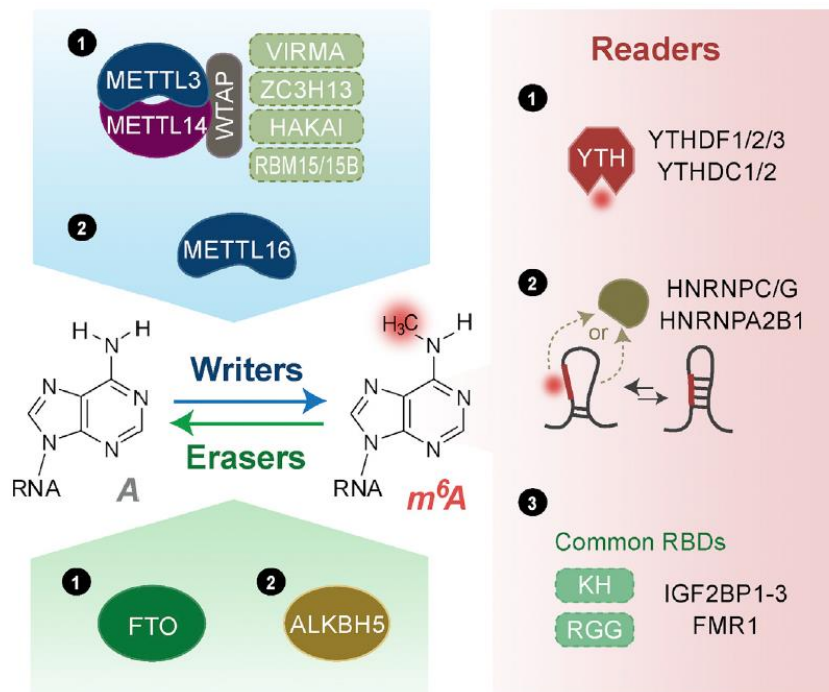


Figure 34 : Les effecteurs de la méthylation m6A : writers, readers et erasers.

Writers, 1 : Les sous-unités centrales (METTL3 et METTL14) du complexe « writers » s'associent à diverses protéines adaptatrices (WTAP, VIRMA, ZC3H13, HAKAI, RBM15/15B) ; **2 :** METTL16 installe m6A au sommet d'une structure en épingle à cheveux dans le transcrit MAT2A.

Erasers : Deux « erasers » ont été identifiés comme enlevant la marque m6A (FTO et ALKBH5).

Readers : Trois classes de protéines « readers » utilisent des mécanismes différents pour préférer lier les ARN contenant des marques m6A.

(H. Shi, Wei, et He 2019)

La modification m6A est l'une des modifications internes les plus répandues des ARNm et des ARN non-codants. Elle est hautement sélective et régulée de manière dynamique dans tous les aspects des fonctions physiologiques, comme l'homéostasie des protéines, la signalisation

cellulaire ou encore la structure de l'ARNm. Des mutations dans les enzymes de modifications m⁶A ont été associées à des maladies ; notamment des cancers, des maladies cardiovasculaires, des maladies métaboliques ou encore des troubles neurologiques. Cela souligne une fois de plus l'importance de cette méthylation à la fois dans les conditions physiologiques que dans les conditions pathologiques (Jonkhout et al. 2017). En 2012, le rôle de m⁶A comme site d'amarrage a été établi pour le recrutement de protéines liant les ARN comme ELAV1, YTHD2 et YTHD3, qui pourraient ensuite recruter d'autres partenaires protéiques (Dominissini et al. 2012).

De même, la modification 5mC de l'ARN, un marqueur épi-transcriptomique commun identifié pour la première fois en 1974, est présent à la fois dans l'ARNm et dans l'ARN non-codant, où il régule la traduction (Desrosiers, Friderici, et Rottman 1974). Cependant, les rôles de cette méthylation sont largement inconnus et l'identification des auteurs de ce marquage n'a commencé que très récemment. En effet, un premier membre responsable de cette méthylation a été mis en évidence dans les années 2000 : la méthyltransférase NSYN (NOP2/Sun RNA methyltransferase) (Peixoto et al. 2020).

C. La méthylation des protéines et des histones

Les modifications post-traductionnelles des protéines permettent d'étendre les structures moléculaires au-delà des limites imposées par les 20 acides aminés codés et si elles sont réversibles, ces modifications permettent de contrôler l'expression protéique ou encore de créer une cascade de signalisation. L'acétylation, la méthylation et la phosphorylation sont les modifications les plus courantes. Les méthylations se produisent principalement par des réactions de N-méthylation ou C-méthylation. On retrouve le plus souvent la N-méthylation de la lysine, de l'arginine, de la glutamine, de l'histidine, de l'alanine, de la phénylalanine, de la proline, de l'asparagine ou encore de la méthionine. Concernant la C-méthylation il s'agit le plus souvent d'une O-méthylestérification des résidus de glutamate, d'acide aspartique et de leucine (Polevoda et Sherman 2007). De plus, on peut noter qu'il existe aussi un autre type de méthylation qui est la S-méthylation des résidus cystéine (Lapko et al. 2005).

Les enzymes qui catalysent ces réactions de méthylation utilisent généralement la SAM comme donneur de méthyle. Cette méthylation est irréversible. Cependant, on peut tout de même noter qu'une méthylation réversible des résidus glutamates est impliquée dans la réponse chimiotactique (Polevoda et Sherman 2007).

La méthylation des lysines ou des arginines dans les protéines ne se produit pas uniquement dans les histones. En effet, de nombreuses protéines qu'elles soient nucléaires ou cytoplasmiques ont été mises en évidence possédant une ou plusieurs méthylations. Certaines histones méthyltransférases (HMT) méthylent non seulement les histones mais aussi des protéines non-histones. Les fonctions régulatrices de la méthylation des protéines ne se limitent pas au « code histone », mais sont impliquées dans un certain nombre d'autres processus cellulaires et biologiques. Parmi les cibles de la méthylation, on peut citer des

facteurs de transcriptions comme p53, TAF10, TAF7, E α , RAR α , RIP140, NF κ B ou encore G9a (Egorova, Olenkina, et Olenina 2010). De plus, la méthylation peut se produire sur des protéines impliquées dans la traduction et non seulement sur les ARNt et les ARNr. En effet, certaines protéines ribosomiques et facteurs de traduction comme EF-1 α , par exemple, subissent une méthylation principalement au niveau de résidus arginine (Polevoda et Sherman 2007). Enfin, d'autres protéines peuvent subir des méthylations régulatrices de leur activité comme l'ATP synthase retrouvée triméthylée et associée au développement de troubles neurodégénératifs (Katz et al. 1994), la calmoduline qui est protégée de la destruction dans le protéasome grâce à sa triméthylation chez la drosophile (Takemori et al. 2007) ou encore VEGFR1 dont la diméthylation permet une augmentation de son activité enzymatique (Kunizaki et al. 2007).

Il y a une cinquantaine d'années, Roger Kornberg proposait que la chromatine consistait en une répétition d'unités nucléosome, contenant deux copies de chacun des quatre types d'histones différentes avec environ 200 paires de bases d'ADN (Kornberg 1974). Une analyse en haute résolution de ces différentes particules nucléosome a révélé des détails sur la particule centrale avec la double hélice d'ADN torsadée faisant deux tours autour de cette particule nommée histone. Les histones sont des séquences d'acides aminés légèrement différentes qui peuvent contribuer à la diversité des types de nucléosomes et des fonctions au sein d'un même chromosome.

De la même manière que la mise en évidence de la méthylation de l'ARN, la méthylation des histones a été découverte dans les années 1962 mais a nécessité de nombreuses années d'étude avant d'identifier les enzymes responsables de la méthylation ou de la déméthylation. Les histones sont donc des protéines intrinsèquement liées à l'ADN pouvant subir de nombreuses modifications post-traductionnelles comme la méthylation et l'acétylation (des lysines et des arginines principalement), la phosphorylation des sérines et des thréonines, la SUMOylation, l'ubiquitylation ou encore la ribosylation. Parmi ces marques, l'acétylation et la méthylation constituent les modifications impliquées dans la régulation épigénétique. Ces modifications peuvent concerner des mono-, di- et triméthylations sur le même résidu. En outre, la diméthylation des arginines peut être symétrique ou asymétrique. En fonction du résidu cible, du niveau de méthylation et de la symétrie, le marqueur méthylé peut être interprété comme un marqueur permissif ou répressif de la transcription des gènes (Peixoto et al. 2020). Les protéines contenant des chromodomaines c'est-à-dire des protéines responsables des modifications de l'organisation de la chromatine présentent un domaine d'environ 40 à 50 acides aminés reconnaissant spécifiquement la chromatine et en particulier les méthylations des histones afin de réguler l'expression des gènes. Bien que le rôle de ces protéines soit suspecté depuis les années 90, le lien entre méthylation des histones et ces protéines n'a été identifié qu'en 2001 grâce à l'identification de la protéine hétérochromatine 1 (HP1). L'identification de ces protéines a permis de mieux comprendre comment les marqueurs épigénétiques régulent véritablement l'expression des gènes en accord avec le code histone (Lachner et al. 2001).

Contrairement aux histones acétyltransférases qui ne sont pas spécifiques d'un seul résidu, la méthylation des histones est catalysée spécifiquement sur un résidu particulier et la redondance d'activité est assez limitée. Pour ces raisons, l'identification des HMT responsables de chaque méthylation a pris environ une douzaine d'années. En effet, bien que certaines protéines aient été connues pour leur implication dans la répression de l'expression des gènes, leur activité HMT n'a été identifiée que bien plus tard. Les HMT contiennent un domaine SET comprenant environ 130 acides aminés. Ce domaine SET possède une activité catalytique envers les résidus lysine pour la mono-, di- et triméthylation en utilisant la SAM comme donneur de groupement méthyle (Peixoto et al. 2020). Il est surprenant de constater que la découverte des déméthylases ou « m6A erasers » soit intervenue beaucoup plus tard. En effet, la méthylation des histones a longtemps été considérée comme un marqueur permanent. La première déméthylase a été mise en évidence en 2004 avec la résolution de l'activité moléculaire de l'histone déméthylase spécifique de la lysine (LSD1) initialement nommée KIAA0601 (Y. Shi et al. 2004).

La méthylation des arginines et des lysines des histones peut influencer l'activation ou la répression de la transcription. Les lysines sont méthylées par des lysines méthyltransférases (HKMT) pour former des lysines mono-, di-, ou triméthylées (code mono lettre : K) 4, 9, 27, 39 et 79 de l'histone 3 et sur la lysine 20 de l'histone 4. Des analyses récentes à l'échelle du génome ont mis en évidence une corrélation entre la méthylation des histones et la transcription. Un schéma typique de méthylation des histones se retrouve sur les promoteurs, les isolateurs, les « enhancers » et les régions transcrites (Nimura, Ura, et Kaneda 2010). La méthylation H3K9me1, H3K27me1, H4K20me1 et H3K4me1 (monométhylation) ainsi que la triméthylation H3K36me3 sont retrouvées dans les régions activement transcrites. Au contraire, les méthylations H3K9me3, H3K27me3 et H3K79me3 sont retrouvées plutôt dans les régions silencieuses. De plus, la triméthylation H4K20me3 est elle aussi connue pour être impliquée dans la répression de l'expression des gènes et est retrouvée principalement dans les régions télomériques, satellites et dans les répétitions terminales. Ces diverses observations indiquent que chaque méthylation d'histone a un rôle distinct dans la régulation de la transcription et dans la conformation de la chromatine (Mikkelsen et al. 2007) (*Figure 35*).

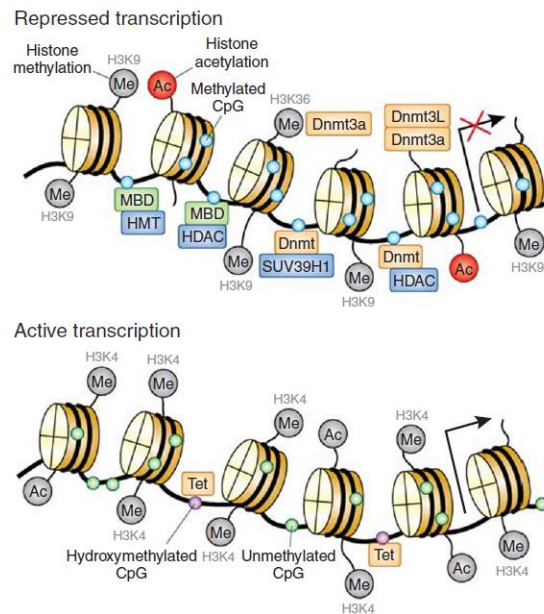


Figure 35 : Les divers types de méthylation des histones et leur impact sur l'activation ou la répression de la transcription.

La méthylation est régulée par des protéines telle que DNMT et Tet (violet) qui sont impliquées dans l'addition active ou la modification chimique de l'ADN (en gris). Pour réprimer l'expression des gènes, les DNMT ciblent les sites CpG et méthylent activement l'ADN. Pour certaines DNMT l'activité catalytique est renforcée par l'association avec les queues histone et avec DNMT3L. La méthylation de l'ADN est reconnue par des protéines liant les méthyles telles que MBD (en vert) et des histones déacétylases (HDAC) (en bleu).

(Moore, Le, et Fan 2013a)

Chez les mammifères, les résidus arginines peuvent aussi être mono- ou diméthylés de manière symétrique ou asymétrique. Il s'agit des résidus arginines (code mono lettre : R) 2, 8, 17 et 26 de l'histone H3 et du résidus 3 de l'histone H4. Les arginines sont méthylées par des enzymes arginine méthyltransférases (PRMT). Les PRMT de type I catalysent les diméthylations asymétriques alors que les PRMT de type II les diméthylations symétriques (Nimura, Ura, et Kaneda 2010). La marque H3R2me1 est liée à l'activation de la transcription mais la diméthylation asymétrique de ce résidu induit une répression de la transcription en agissant sur l'inhibition de la triméthylation H3K4me3 (Hyllus et al. 2007). On estime qu'il existe 55 histones méthyltransférases (Shen et al. 2020a).

D. La méthylation des lipides

Les phospholipides font partie de la classe des lipides constitués de deux acides gras, un groupement phosphate et une molécule de glycérol. Le métabolisme des phospholipides joue un rôle clé dans la physiologie cellulaire. En effet, les phospholipides sont des composants clés des membranes plasmiques formant la bicouche lipidique. La phosphatidylcholine (PC) est un des phospholipides les plus important qui possède la choline comme molécule de cœur. La PC représente 40 à 50 % des phospholipides cellulaires (Sundler et Akesson 1975). En plus de former les membranes, la PC est aussi nécessaire à la biosynthèse des lipoprotéines, du surfactant alvéolaire ou encore de la bile. Chez les mammifères, la PC est synthétisée par deux voies de signalisation spécialisées. La première voie de signalisation est dépendante de la CDP-

choline, dérivant de la choline, qui a été découverte dans les années 1950 (Kennedy et Weiss 1956). Toutes les étapes de cette biosynthèse se réalisent au niveau nucléaire grâce à la phosphocholine cytidyltransférase (*Figure 36*).

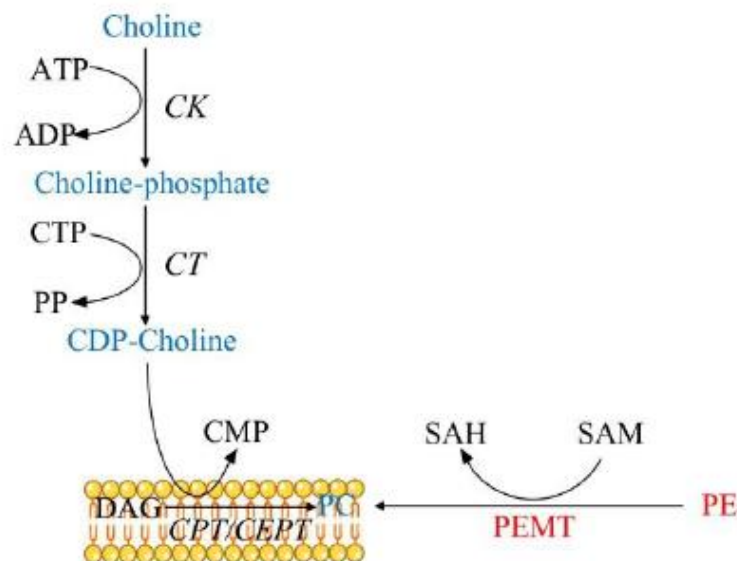


Figure 36 : Voies de signalisation impliquées dans la synthèse de la phosphatidylcholine.

Modèle topologique de la phosphatidyléthanolamine-N-méthyltransférase (PEMT) dans la membrane du réticulum endoplasmique (RE).

Abréviations : CK, choline kinase ; CT, CTP-choline phosphate cytidyltransférase ; CPT/CEPT, CDP-choline phosphotransférase ; PE, phosphatidyléthanolamine.

(J. Li et al. 2023)

La choline est un acide aminé essentiel apporté par l'alimentation. Elle sert de source de groupement méthyle. De plus, la choline joue un rôle dans la régulation de l'expression des gènes, dans la signalisation membranaire et dans le métabolisme lipidique (J. Li et al. 2023). En plus de son apport exogène, la choline peut être produite *de novo* et cette production contribue à la synthèse de PC en absence de choline exogène. La seconde voie de synthèse se produit principalement dans le foie et est caractérisée par trois réactions de méthylation séquentielles aboutissant à la synthèse de PC à partir de phosphatidyléthanolamine (PE) via la phosphatidyléthanolamine-N-méthyltransférase (PEMT). On estime que 30 % de la PC produite provient de la PEMT (DeLong et al. 1999) (*Figure 37*).

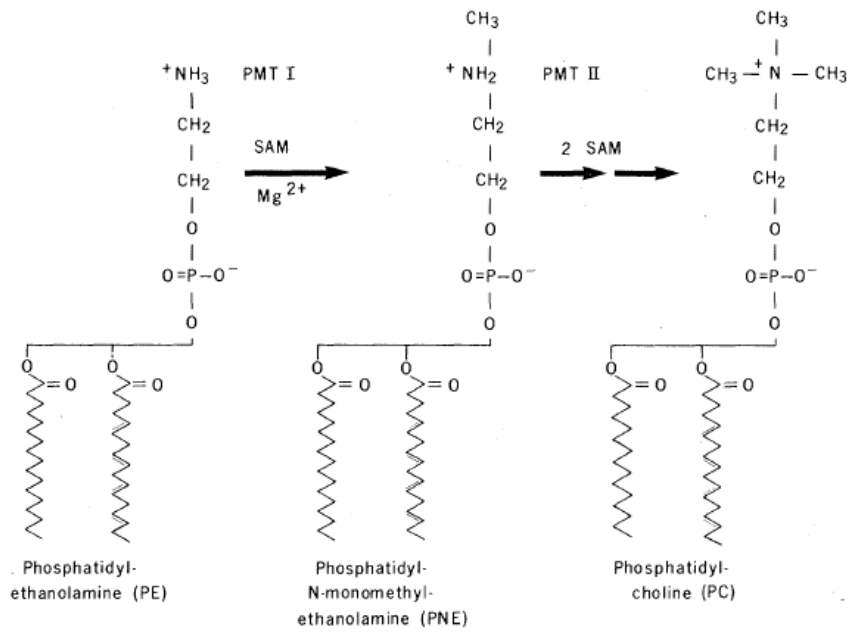


Figure 37 : Conversion enzymatique de la phosphatidyléthanolamine en phosphatidylcholine.

Abréviations : *PMT I et II, phospholipide méthyltransférase I et II ; PE, phosphatidyléthanolamine ; PC, phosphatidylcholine. (Hirata et Axelrod 1980)*

Cette cascade de méthylation aboutit à une translocation des lipides de la couche interne vers la couche externe de la bicouche lipidique formant la membrane plasmique. Ce processus permet de rendre plus fluide les membranes et donc de permettre le passage de diverses molécules via la diffusion passive. En effet, les lectines, les immunoglobulines, les chimiokines ou encore les catécholamines se lient sur les membranes et stimulent les méthyltransférases lipidiques ce qui permet de réduire la viscosité de la membrane plasmique (Hirata et Axelrod 1980).

Chapitre 5 : Les interactions protéine-protéine impliquées dans le cycle de la méthionine et la synthèse de SAM

I. Généralités

Des décennies de recherche en biologie cellulaire, biologie moléculaire, biochimie, biologie structurale et biophysique ont produit un remarquable recueil de connaissances sur la fonction et les propriétés moléculaires des protéines individuelles. Ces connaissances sont bien enregistrées et classées dans des bases de données de protéines comme UniProt ou Human Protein Atlas. Cependant, les protéines agissent rarement seules. Souvent, elles s'associent les unes aux autres pour former des machines moléculaires en formant des connections physico-chimiques dynamiques pour assurer des fonctions biologiques au niveau cellulaire et systémique (Acuner Ozbabacan et al. 2011). En effet, les interactions entre protéines sont essentielles et impliquées dans de nombreux processus biochimiques et dans les cascades de signalisation cellulaire. Un éventail large de processus biologiques tels que la fixation des récepteurs hormonaux, les transductions des signaux, l'allostérie des enzymes, l'inhibition des protéases et la correction des protéines mal repliées par les chaperonnes contiennent des interactions transitoires entre les protéines (Valdar et Thornton 2001). Maintenant, on commence de plus en plus s'intéresser à ces réseaux entre protéines en essayant d'élucider les relations moléculaires complexes en cartographiant les interactions physiques protéine-protéine (De Las Rivas et Fontanillo 2010). La carte complète des interactions protéine-protéine qui peuvent se produire dans un organisme vivant s'appelle l'interactome (Cusick et al. 2005). La cartographie de l'interactome est devenue l'un des principaux champs d'application de la biologie actuelle de même que l'étude du génome a été la force motrice de la biologie moléculaire il y a une trentaine d'années (De Las Rivas et Fontanillo 2010). L'élucidation de ces interactomes repose sur le développement de nouvelles technologies permettant la mesure des connexions physiques à l'échelle du protéome.

Une interaction protéine-protéine (IPP) est communément définie par un contact physique avec un ancrage moléculaire entre protéines qui se produit dans une cellule ou dans un organisme vivant *in vivo*. La question est donc de savoir si les protéines partagent un « contact fonctionnel » ou si elles interagissent directement l'une avec l'autre. En effet, les protéines de l'appareil transcriptionnel et du ribosome partagent un contact fonctionnel avec d'autres protéines du complexe mais n'interagissent pas physiquement toutes ensemble. Le contact physique pris en compte dans les IPP doit être spécifique et ne pas concerner toutes les protéines qui se rencontrent au hasard. Il doit également exclure les interactions qu'une protéine effectue lorsqu'elle est fabriquée, pliée contrôlée ou dégradée. Le fait que les IPP impliquent un contact physique entre protéines ne signifie pas que ces contacts sont statiques ou permanents. La machinerie cellulaire subit un renouvellement et un réassemblage continu (Acuner Ozbabacan et al. 2011). Certains assemblages de protéines sont stables parce qu'ils constituent des complexes macromoléculaires comme par exemple l'interaction entre 8

protéines différentes chez les mammifères pour synthétiser l'ATP. Ces protéines incluses dans des gros complexes sont aussi appelées sous-unités. D'autres assemblages ne se produisent que de manière transitoire comme par exemple pour l'activation de l'expression des gènes par liaison de facteurs de transcription et d'activateurs dans les régions promotrices de l'ADN. Un autre élément essentiel pour définir les IPP est le contexte biologique. Toutes les interactions possibles ne se produiront pas toutes au même moment. Au contraire, ces interactions dépendent du type cellulaire, de la phase et l'état du cycle cellulaire, du stade de développement, des conditions environnementales, des modifications post-traductionnelles ou de la présence de cofacteurs ou de partenaires de liaisons (De Las Rivas et Fontanillo 2010).

II. Les méthodes d'identification d'interactions protéine-protéine

Les réseaux métaboliques et de régulation sont tous deux régis par des IPP. Toutefois, on observe différents types de complexes ayant des fonctions spécifiques : les grands complexes macromoléculaires tels que les ribosomes sont très stables et permanents alors que les interactions dynamiques et transitoires sont des éléments clés des réseaux de signalisation et de régulation. Les interactions peuvent être classées en fonction de leur composition, de leur affinité et de leur durée de vie (S. H. Park et al. 2009).

Il est indispensable de faire la distinction entre les IPP prouvées expérimentalement et les IPP prédites. Les IPP peuvent être mises en évidence par différents types d'expérience comme les approches binaires et co-complexes, l'utilisation d'étiquette et les méthodes de purification, la co-immunoprécipitation, les méthodes utilisant la fluorescence (Duolink® Proximity Ligation Assay et FRET), la résonance plasmonique de surface, la spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN) et plus récemment la cristallographie à rayons X et la cryo-microscopie. En effet, de nombreuses bases de données répertorient les IPP, mais certaines sont des répertoires d'IPP prouvées de manière expérimentale dans la littérature alors que d'autres sont issues de logiciels de prédiction informatique (De Las Rivas et Fontanillo 2010). Concernant les répertoires d'IPP, on peut citer iHOP qui permet d'identifier des IPP précédemment reportées dans la littérature, BioGRID qui est un référentiel d'interactions protéiques avec des données compilées de la littérature, HuRI qui répertorie les interactions déterminées par un pipeline de cartographie binaire systémique ainsi que d'autres interactions prouvées dans la littérature, IntAct qui est une base de données répertorient toutes les interactions expérimentales avec une soumission directe des utilisateurs et BioPlex qui est une analyse systématique des IPP basée sur l'expression d'une protéine taguée suivi de co-IP (Hu et al. 2021) (Schweppe et al. 2018). Pour les logiciels de prédictions, on retrouve principalement STRING qui permet de cartographier les IPP, prouvées expérimentalement ou prédites, d'associations directes ou indirectes et FpClass qui prédit plus de 250 000 interactions parmi plus de 10 000 protéines humaines à l'échelle du protéome (Kotlyar et al. 2015).

III. Les interactions impliquées dans le cycle de la méthionine et dans la synthèse de SAM

A. L'interactome de la méthionine synthase

La formation de complexe multienzymatique ou interactome est un processus courant dans la régulation des métabolismes. En effet, on retrouve ce processus dans de nombreuses voies de signalisation comme la glycolyse, le cycle de l'acide tricarboxylique, la synthèse des purines ou encore le catabolisme des chaînes d'acides aminés branchés. Le métabolisme des monocarbones ne fait donc pas exception. En effet, il est prouvé dans la littérature que les enzymes méthionine synthase et méthionine synthase réductase interagissent l'une avec l'autre. En effet, de manière occasionnelle la cob(I)alamine est oxydée en cob(III)alamine inactivant la MS. Pour réactiver la MS, cette dernière doit former un complexe avec la MSR. Le domaine d'activation de la MS en C-terminal va interagir avec le domaine de liaison FMN de la MSR afin de catalyser le transfert d'électron provenant de l'oxydation du NADPH chez la MS (J. Zhang et al. 2020a). Les résidus acides du domaine FMN sont capables d'interagir via des liaisons électrostatiques avec des résidus basiques du domaine d'activation de la MS. Cette interaction est responsable d'un changement conformationnel des deux enzymes induisant des modifications des paramètres thermodynamiques (Wolthers et al. 2007).

De plus, une étude du laboratoire publiée en 2013 a commencé à mettre en évidence d'autres partenaires de la MS (Fofou-Caillierez et al. 2013). En effet, il est connu que les patients cblG variant (cblG*) présentent une diminution de la conversion entre la CNCbl et l'OHcbl de manière similaire à ce qui est observé chez les patients cblC. Partant de ces observations, l'équipe s'est demandée si la MS, même tronquée, pouvait interagir avec MMACHC. Il est déjà connu de la littérature que la protéine MMACHC est capable d'interagir avec MMADHC et la vitamine B12 dans le cytoplasme (Plesa et al. 2011). Le laboratoire a mis en évidence l'interaction entre MMACHC et la MS pouvant témoigner d'un mécanisme de régulation des processus dépendant de MMACHC dans la prise en charge de la cobalamine. En effet, il a été montré que MMACHC présente la cobalamine en position "base-off" à la MS. De plus, il est connu que MMADHC possède un signal d'import mitochondrial lui permettant d'adresser la vitamine B12 vers la mitochondrie. Or, MMACHC ne possède pas de signal d'import mitochondrial ce qui pourrait suggérer qu'elle interagit avec la MS au même moment qu'elle interagit avec MMADHC ou après. L'orientation de la cobalamine vers la modification en AdoCbl pourrait être influencée par la synthèse de MeCbl par MMACHC/MS (Fofou-Caillierez et al. 2013). En complément, l'absence de MMACHC dans les fibroblastes cblC pourrait affecter l'activité de la MS par le biais d'une altération de la transformation de la cobalamine mais aussi en diminuant l'efficacité de l'interaction cruciale entre la MS et la MSR (Fofou-Caillierez et al. 2013). Dans un second temps, le laboratoire a réalisé une nouvelle étude sur l'interactome de la MS et a confirmé les interactions entre MS et MSR, MMACHC et MMADHC. Les auteurs ont montré que les domaines de liaison à la SAM ou de réactivation de la MS pouvaient être impliqués dans une interaction avec MMACHC avec une prédiction de

différents acides aminés de MMACHC impliqués : 80, 109 à 111, 144 à 161 et 200 à 230 (Bassila et al. 2017a). De plus, les résultats obtenus sur cellules HepG2 transfectées avec un siRNA contre MMACHC et sur des fibroblastes de patients cblC ont mis en évidence que MMACHC joue un rôle important dans l'interaction entre MS et MSR probablement en stabilisant le complexe. Enfin, les résultats de l'interaction MMACHC/MMADHC sur des fibroblastes cblG ont mis en évidence que l'absence d'isoforme active de la MS affectait l'interaction entre les deux enzymes cytoplasmiques induisant un impact sur le transport de la vitamine B12 vers la mitochondrie, même chez les patients cblG. D'autres interactions impliquant les protéines du métabolisme intracellulaire de la vitamine B12 peuvent être particulièrement intéressantes. En effet, il a été montré dans la littérature que la protéine LMBD1 et le transporteur ABCD4 impliqués dans la sortie de la cobalamine du lysosome vers le cytoplasme, étaient exprimés au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique (RE). L'interaction entre ces deux protéines est nécessaire pour que ABCD4 soit localisée au niveau de la membrane lysosomale. De plus, il a été montré que ces deux protéines devaient interagir avec MMACHC pour permettre la sortie de la vitamine B12 du lysosome et la prise en charge de cette dernière au niveau cytoplasmique (Deme et al. 2012).

Pris dans leur ensemble, ces résultats indiquent que l'absence d'une des trois protéines cœur, MS, MSR ou MMACHC induit une diminution d'interaction entre les quatre protéines du complexe qui sont MS, MSR, MMACHC et MMADHC. Par conséquent, ces interactions protéine-protéine sont responsables de la localisation lysosomale de LMBD1 et ADBC4, de l'activité chaperonne de MMACHC, ainsi que de la répartition de la cobalamine entre les voies cytoplasmique et mitochondriale (Bassila et al. 2017a).

B. Les interactions impliquant les MATs et les méthyltransférases

L'importance d'atteindre des niveaux adéquats de SAM pour une fonction cellulaire correcte ainsi que la corrélation entre la déficience en SAM et une variété de maladies ont beaucoup attiré l'attention sur les MATs. La plupart des données sur les MATs et leurs implications dans la synthèse des SAM a été mise en évidence dans des cellules cancéreuses et plus particulièrement dans le foie car c'est l'organe qui exprime les trois sous-unités des MATs. Néanmoins, les études d'interactions impliquant les MATs restent très limitées (Portillo, Vázquez, et Pajares 2020a).

Les interactions impliquant les MATs ont été mises en évidence dans différents compartiments subcellulaires. Concernant MAT α 1, des études de co-IP couplées à de la spectrométrie de masse ont mis en évidence un interactome impliquant MAT α 1, BHMT, SAHH et NNMT (nicotinamide N-méthyltransférase) dans le cytoplasme du foie de souris (Hong, Zhai, et Pissios 2018) (*Figure 39*). Au niveau nucléaire, il a été montré que MAT α 1 pouvait interagir avec PDRG1 (P53 and DNA Damage Regulated 1), un oncogène régulé négativement par p53. Cette interaction serait responsable d'un blocage de la synthèse de SAM et serait associée à une hypométhylation de l'ADN particulièrement en cas de dommage hépatique (Pérez et al. 2016). Dans le foie normal, MAT α 1 nucléaire peut aussi se lier à Max et Mnt

contrairement au foie endommagé où MAT α 1 sera préférentiellement retrouvée interagissant avec cMyc, cMaf et MafG (*Figure 38*).

La présence de MAT α 1 au niveau nucléaire suggère donc un import de cette protéine du cytoplasme vers le noyau. Cependant, des études utilisant la leptomycine, un inhibiteur de l'exportine 1 suggère que l'import de MAT α 1 ne passe pas par une interaction de cette protéine avec CRM1, une protéine du port nucléaire. Sa localisation pourrait potentiellement être due à une modification post-traductionnelle (Yang et al. 2016).

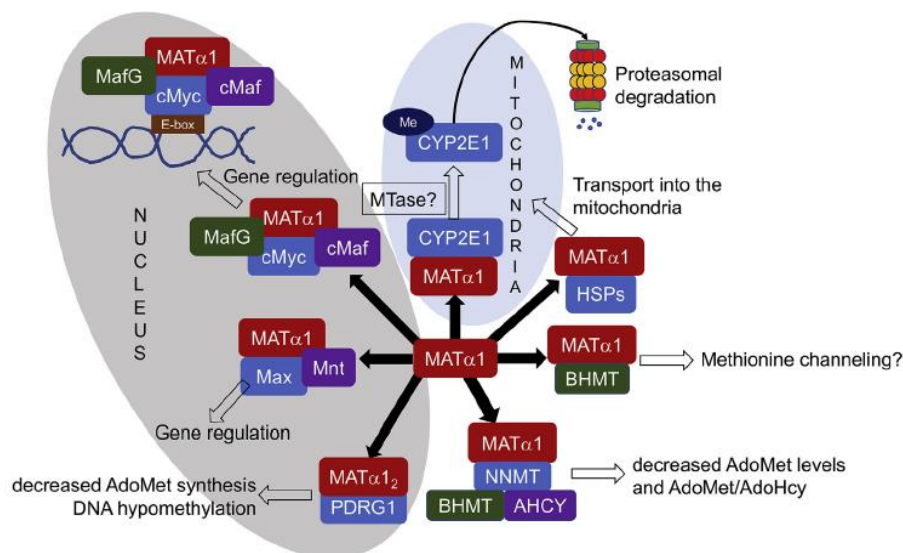


Figure 38 : Interactions protéine-protéine impliquant MAT α 1.

Cette figure répertorie les interactions connues et prouvées expérimentalement impliquant MAT α 1 dans les divers compartiments subcellulaires.

(Portillo, Vázquez, et Pajares 2020)

La distribution nucléocytoplasmique de MAT α 2 lui permet d'interagir avec une variété de cibles dans les différents compartiments (*Figure 39*). Au niveau nucléaire la sous-unité catalytique MAT α 2 peut interagir avec la culline 3. Cette interaction induit une diminution de la stabilité de l'ARNm MAT2A codant MAT α 2, une sensibilité accrue de la sous-unité à l'ubiquitylation et donc une induction de sa dégradation par le protéasome (J. Wang et al. 2016). Une autre étude a mis en évidence une interaction de MAT α 2 avec l'oncoprotéine MafK mais aussi avec des histones lysines méthyltransférases (G9a/Ehmt2, Ehmt1, ALL1/KMT2A, SETDB1 et Suv39h1), ou encore des protéines impliquées dans la répression de la transcription (PRC1), dans le remodelage de la chromatine (Swi/Snf) et dans la réparation de l'ADN (PARP1). Le rôle de ces interactions a été élucidé dans un premier temps en montrant que l'interaction MAT α 2/MafK agissait comme un corépresseur de MafK en se liant à des éléments de réponse antioxydant (ARE) du promoteur de l'hème oxygénase 1 (HO-1) (Katoh et al. 2011a), et dans un second temps que cette interaction induisait le recrutement de la méthyltransférase SETDB1 sur le promoteur du gène COX-2 (Kera et al. 2013b). De plus, une variété de modifications post-traductionnelles a été détectée sur MAT α 2, ce qui suggère de possibles interactions transitoires avec de nombreuses protéines modificatrices. Parmi elles, la protéine

kinase 1 (MEK) et l'enzyme réalisant l'ubiquitylation E1 (UBE21/Ubc9) phosphorylent et SUMOylent MAT α 2 favorisant son interaction avec le régulateur de l'apoptose Bcl2 (Tomasi et al. 2015).

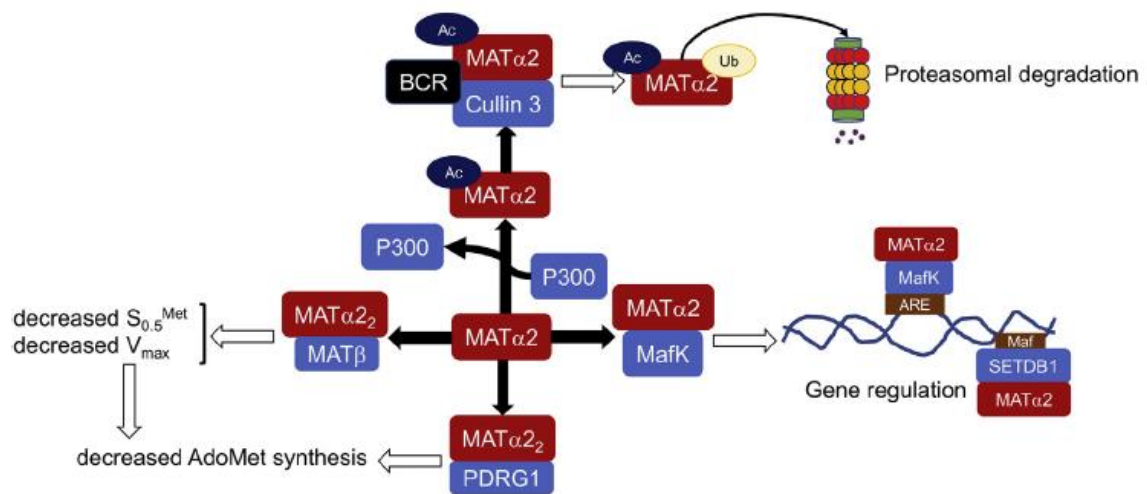


Figure 39 : Interactions protéine-protéine impliquant MAT α 2.

Cette figure répertorie les interactions connues et prouvées expérimentalement impliquant MAT α 1 dans les divers compartiments subcellulaires.

(Portillo, Vázquez, et Pajares 2020a)

B. Les interactions impliquant les MATs, SIRT1 et HuR

Importance de SIRT1 et HuR dans le métabolisme de la cobalamine

Plus de 200 patients dans le monde n'ont pas de diagnostic génétique malgré la présentation métabolique évocatrice des défauts héréditaires du métabolisme de la vitamine B12. Cela pourrait donc suggérer des processus impliquant d'autres gènes encore non-identifiés. De plus, les mécanismes à l'origine de la grande variabilité des symptômes cliniques et de la faible efficacité de la thérapie conventionnelle sont loin d'être élucidés. Une partie de l'explication pourrait être liée à la complexité des pathomécanismes produits par la voie de reméthylation défectueuse. L'homocystéinémie et la production d'espèces réactives d'oxygène ou ROS sont augmentées et la défense contre le stress oxydant est diminuée dans les fibroblastes de patients (Richard et al. 2009). Dans ce contexte, il y a quelques années, des travaux du laboratoire ont mis en évidence que le déficit en cobalamine avait pour conséquence la mise en place d'un stress du réticulum endoplasmique (RE) provoqué par la diminution de l'expression de la désacétylase dépendante du NAD⁺ SIRT1 (Garcia et al. 2011). Cette diminution d'expression de SIRT1 induit une augmentation de l'acétylation du facteur de transcription HSP1 ce qui entraîne une diminution de son activité nécessaire à la production de chaperonnes conduisant donc au stress du RE (R. Ghemrawi et al. 2013). De plus, cette diminution d'expression de SIRT1 a été expliquée par une altération de la navette nucléocytoplasmique de protéines liant les ARNm (RBP) incluant la protéine de réponse au stress HuR et ses ARNm cibles, dont l'ARNm de SIRT1 (Battaglia-Hsu et al. 2018). La diminution de l'expression de SIRT1 altère la réponse au stress du RE, le métabolisme énergétique

mitochondrial et la neuroplasticité par l'inactivation de la co-activation des récepteurs nucléaires dans le cerveau, le cœur et le foie par PGC-1 α (Garcia et al. 2011; R. Ghemrawi et al. 2013). Des mécanismes similaires se produisent dans les fibroblastes de patients et dans le cerveau, le foie et le cœur des souris transgéniques *Cd320* KO et *Mtr* KO dans le cerveau. L'ensemble de ces données montre que le stress oxydant, le stress du RE, les dysrégulations épigénomiques et l'altération du transport nucléo-cytoplasmique des ARNm sont des pathomécanismes clés qui interagissent avec les défauts héréditaires du métabolisme de la vitamine B12 et que la diminution de l'activité de SIRT1 joue un rôle essentiel dans ces mécanismes (Hassan et al 2024, résultats en cours de publication). Dans ce contexte, le laboratoire teste depuis quelques années des « sirtuin-activating compounds » (STACs), des activateurs pharmacologiques spécifiques de SIRT1 comme stratégie thérapeutique innovante. L'un de ces composés, le SRT1720 a par ailleurs été testé par le laboratoire sur un modèle cellulaire de carence en vitamine B12 (TO/OT) et sur des animaux KO pour le gène *Mtr* dans le cerveau et a montré des résultats prometteurs sur la diminution du stress, la correction de la localisation aberrante des RBP ou encore les symptômes neurocognitifs (Rose Ghemrawi et al. 2019). Cependant, ce composé présente une certaine toxicité à forte dose. C'est pourquoi le laboratoire a sélectionné un autre STAC, le SRT2104 pour la suite des études *in vitro* et *in vivo*.

Les interactions entre les MATs, SIRT1 et HuR

L'interaction la plus connue impliquant MAT α 2 est la formation de l'enzyme MAT II résultant de l'interaction entre la sous-unité catalytique MAT α 2 et la sous-unité régulatrice MAT β . Des analyses de cristallographie à rayon X ont mis en évidence que MAT II était un hétéro-trimère composé de deux sous-unité MAT α 2 et d'une sous-unité MAT β . De plus, il a été mis en évidence que l'homo-oligomère MAT α 2 produisait plus de SAM et que MAT II était associée à une diminution de la synthèse de ce métabolite (Pajares et Pérez-Sala 2018). Cette différence d'oligomérisation, d'activité et de production SAM peut être expliquée par l'existence de variants d'épissage de MAT α 2 et MAT β . En effet, il est connu dans la littérature que MAT α 2 peut être retrouvée sous une forme ne possédant pas l'exon 8 du gène *MAT2A*. Pour MAT β on retrouve aussi deux variants (V1 et V2) différant par la séquence de l'exon 1 sur le gène *MAT2B* (Yang et al. 2008). Dans l'ensemble, on peut s'attendre à une gradation des activités de MAT II en raison de l'association de différentes formes d'épissage de MAT β dans l'hétérodimère. Concernant les cibles d'interactions de MAT β on peut citer la déacétylase dépendante du NAD⁺ SIRT1, GIT1 (ARF GTPase activating protein), MEK1 (mitogen-activated protein kinase), ERK2 (extracellular signal regulated kinase), diverses protéines kinases (B-Raf, cRaf, Ras), MAT α 2, DDX1 (DEAD box polypeptide 1), SF3B3 (splicing factor 3b subunit 3), CPS57 (pre-mRNA cleavage factor 1) et diverses "heat shock" protéines. En outre, les partenaires spécifiques de MAT β V1 comprennent la protéine de stabilisation de l'ARNm HuR (antigène humain R aussi connu sous le nom de ELAV1), l'asparaginyl-ARNt synthétase (NARS) et le facteur de spécificité de clivage et de polyadénylation 6 (CPSF6), tandis que le précurseur du facteur de croissance des cellules souches (CLEC11A) et l'hélicase de l'ARN ATP-dépendante

(DDX3) sont spécifiques de V2. Parmi ces cibles d'interaction, plusieurs sont des protéines nucléaires ce qui suggère une distribution nucléocytoplasmique de MAT β (Xia et al. 2010).

Un intérêt particulier a été porté à l'interaction MAT β /HuR dans des cellules d'hépatocarcinome où des différences dans les niveaux d'expression de V1 et V2 ont affecté le contenu cytoplasmique de HuR qui a augmenté lors de leur surexpression. Ces modifications de la distribution subcellulaire influencent la progression du cycle cellulaire car HuR est impliqué dans la stabilisation de l'ARNm de nombreuses cyclines. Inversement, dans le foie normal, une faible expression de MAT β associée à des niveaux élevés de SAM contrebalance ces effets par la méthylation de HuR qui, à son tour, contribuera à la déstabilisation de l'ARNm de MAT2A (Vázquez-Chantada et al. 2010). Concernant MAT β , SIRT1 et HuR, une étude de 2013 a mis en évidence une interaction entre ces 3 protéines. De plus, ils ont mis en évidence qu'un traitement au resvératrol, un polyphénol naturel activateur de SIRT1 ayant des effets pro-apoptotique et suppresseur de croissance dans les cellules cancéreuses hépatiques, était capable de stabiliser le complexe MAT β /SIRT1/HuR et d'induire la dissociation de MAT β /MAT α 2 permettant *in fine* une augmentation de la synthèse de SAM (Yang et al. 2013b) (Figure 40).

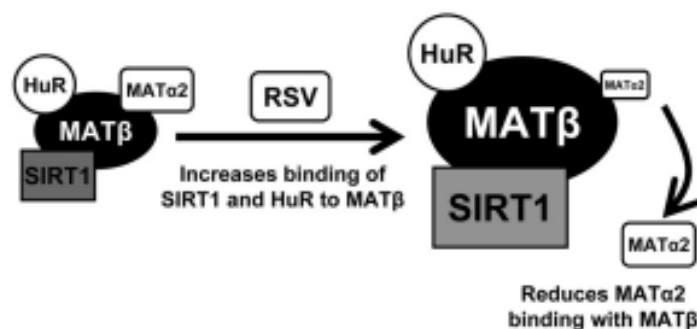


Figure 40 : Modèle de l'interaction entre MAT β , HuR et SIRT1 et l'effet d'un traitement au resvératrol sur cet interactome.

MAT β peut interagir avec MAT α 2, HuR et SIRT1. En cas de traitement au resvératrol, un activateur naturel de SIRT1, MAT β interagit plus fortement avec SIRT1 et HuR ce qui induit une dissociation de MAT α 2.

MAT α 2 et MAT β : méthionine adénosyltransférase ; HuR : antigène humain R ; SIRT1 : histone déacétylase sirtuine.

(Yang et al. 2013b)

Chapitre 6 : Rôle clé de la compartimentation subcellulaire dans les interactions entre voies métaboliques et épigénétiques

I. Généralités

Le terme « compartimentation » signifie l'action de compartimer, de partager ou de segmenter. En biologie c'est un terme qui est de plus en plus employé afin de comprendre et d'expliquer les bases du métabolisme des organismes complexes. Cette notion de compartimentation peut être retrouvée au niveau de l'organisme entier mais aussi au niveau cellulaire (Srere 1967). La compartimentation peut se définir par 3 notions : une séparation physique via des membranes, une colocalisation des enzymes et une canalisation du substrat par des superstructures enzymatiques (Zecchin et al. 2015a). La présence de ce complexe multienzymatique transitoire et réversible peut être appelé métabolon. La formation des métabolons permet donc une canalisation des substrats métaboliques ainsi qu'un transfert direct de substrats et de produits permettant la médiation de la communication et de la régulation. Cela permet la création d'un réseau métabolique stable vis-à-vis des intermédiaires métaboliques labiles (Stover et Field 2011).

Le fait de retrouver un métabolisme dans un compartiment particulier ou dans différents compartiments cellulaires est dicté par le temps et l'espace. En effet, nous retrouvons par exemple un pic de glycémie lors de la phase S du cycle cellulaire ce qui témoigne bien de l'importance de l'activation d'un métabolisme à un moment donné (Moncada, Higgs, et Colombo 2012). Durant la phase S du cycle cellulaire, les mitochondries sont retrouvées sous forme fusionnées. Cette fusion est orchestrée par les cyclines D ce qui induit l'inhibition du facteur NRF1 (Nuclear Respiratory Factor) et de PGC1 α (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Coactivator) induisant donc une redistribution des intermédiaires glycolytiques. Après la phase S, les cyclines vont rediriger le métabolisme vers une production d'énergie pour soutenir la ségrégation chromosomique (Lee et al. 2014). Un autre système de régulation temporelle existe, il s'agit du rythme circadien. En effet, le rythme circadien régule l'expression temporelle d'une centaine de gènes par anticipation des cycles alimentation/jeûne et des cycles jour/nuit (Eckel-Mahan et Sassone-Corsi 2013).

En ce qui concerne la notion d'espace, un métabolisme est un microenvironnement permettant et favorisant l'activité optimale d'enzymes spécifiques (Reubsaet et al. 1991). Plusieurs exemples de métabolismes montrent l'importance de la séparation physique. Par exemple, on retrouve le métabolisme des folates dans le cytoplasme et dans les mitochondries, fonctionnant en miroir où chacun est contrôlé par des isoformes dans sa localisation spécifique. Grâce à cette compartimentation, les unités monocarbonées (sérine, glycine et formate) peuvent être dirigées dans des "pools" spécifiques en fonction des besoins cellulaires (Boon, Silveira, et Mostoslavsky 2020). De plus, lors de centaines de réactions

enzymatiques, la synthèse d'intermédiaires toxiques doivent impérativement rester dans un espace clos prédéfini. La compartimentation permet donc de limiter et de prévenir l'échappement d'intermédiaires nécessaires aux réactions tout en maintenant les processus métaboliques sans intervenir directement dans les réactions enzymatiques (Tu et al. 2005). La compartimentation est donc responsable d'une augmentation de l'efficacité des réactions chimiques métaboliques (Zecchin et al. 2015a).

II. Compartimentation du métabolisme de l'acétyl-CoA

L'acétyl-CoA est un prototype d'intermédiaire métabolique compartimenté. C'est un thioester formé d'acide acétique et de coenzyme A. La production de l'acétyl-CoA est réalisée par divers métabolismes comme le métabolisme glucidique lors de la dégradation des glucides qui convertit le pyruvate en acétyl-CoA ou la synthèse directe médiée par les acétyl-CoA synthases. L'acétyl-CoA intervient principalement dans le cycle de Krebs afin de former le citrate mais il est aussi utilisé pour la formation des corps cétoniques via l'enzyme mitochondriale 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA réductase (HMG-CoA), pour la biosynthèse des acides gras via la carboxylation de l'acétyl-CoA en malonyl-CoA par l'acétyl-CoA carboxylase et pour la production du cholestérol (Wellen et Snyder 2019).

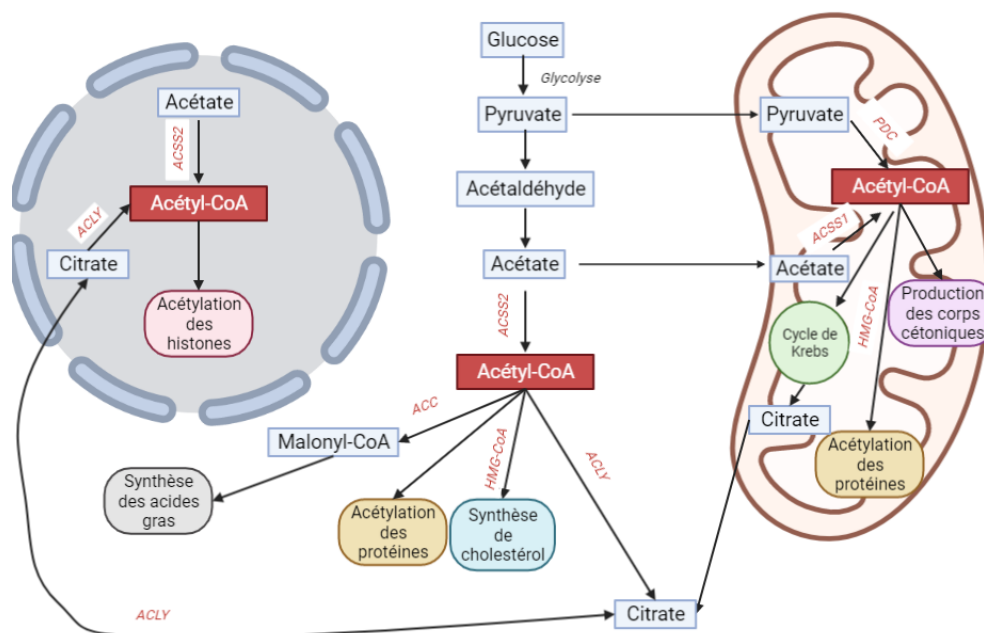


Figure 41 : Compartimentation du métabolisme de l'acétyl-CoA

La voie mitochondriale contribue au cycle de Krebs, à la production de corps cétoniques et à l'acétylation des protéines. La voie cytoplasmique permet la production d'acétyl-CoA directement impliqué la synthèse de novo des lipides, dans la synthèse des stérols et dans l'acétylation des protéines. La voie nucléaire permet l'acétylation des histones.

ACSS1 et 2 : acétyl-CoA synthase ; ACLY : ATP citrate lyase ; HMG-CoA : hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA ; ACC : acétyl-CoA carboxylase ; PDC : pyruvate déshydrogénase

(modifié d'après (Wellen et Snyder 2019))

L'acétyl-CoA est capable de traverser facilement les membranes et de passer du noyau au cytoplasme et inversement via les pores nucléaires. Dans les cellules de mammifères, l'acétyl-

CoA est produit par la mitochondrie, le cytoplasme et le noyau. Le citrate peut être exporté de la mitochondrie vers le cytoplasme et le noyau afin de reformer l'acétyl-CoA via l'ATP citrate lyase (ACLY). L'acétylation des histones est très sensible à la biodisponibilité de l'acétyl-CoA dans la cellule (Wellen et al. 2009). L'acétyl-CoA peut aussi être directement produit dans le cytoplasme et dans le noyau à partir d'acétate via l'acétyl-CoA synthase à chaîne courte 2 (ACSS2). ACSS2 permet la capture et l'utilisation d'acétate exogène ainsi que le recyclage d'acétate produit par les réactions médiées par les histones déacétylase (HDAC) (Bulusu et al. 2017a). Une autre enzyme a aussi été retrouvée dans le noyau et le cytoplasme : la pyruvate déshydrogénase (PDC). Sous certaines conditions, cette enzyme peut être transloquée dans le noyau afin de contribuer à apporter de l'acétyl-CoA pour les réactions d'acétylation des histones (Sivanand, Viney, et Wellen 2018).

On peut donc noter dans le cas de l'acétyl-CoA la présence des différentes enzymes nécessaires à son métabolisme dans différents compartiments cellulaires (cytoplasme, mitochondries, noyau) (Wellen et Snyder 2019) (*Figure 41*).

III. Compartimentation du métabolisme du NAD⁺

Le NAD⁺ ou nicotinamide adénine dinucléotide oxydé est un cofacteur métabolique accepteur d'électrons jouant un rôle dans de nombreux domaines cellulaires comme les réactions redox métaboliques. Il s'agit du substrat de nombreuses enzymes comme la poly-ADP-ribose polymérase (PARP) impliquée dans la mono et poly ADP-ribosylation des protéines ou les sirtuines impliquées dans la désacétylation (Ryu et al. 2018). Une diminution du NAD⁺ peut donc limiter l'activité et la signalisation médiée par les enzymes NAD⁺ dépendantes. L'intérêt récent pour l'étude des fonctions du NAD⁺ a été motivé par le désir de moduler les voies métaboliques ainsi que les voies de signalisation dépendantes de ce cofacteur afin de contrer les troubles métaboliques, la tumorigénèse, l'inflammation, la neurodégénérescence et les maladies cardiovasculaires. La dynamique des concentrations subcellulaires et extracellulaires présente donc un mécanisme émergent dans la régulation des voies de signalisation dépendantes du NAD⁺ (Houtkooper et al. 2010a).

Les enzymes utilisant le NAD⁺ sont localisées dans des compartiments subcellulaires spécifiques pour exécuter des fonctions spécifiques liées à la synthèse et à la fonction de compartimentation du NAD⁺. Il existe une compartimentation distincte entre la forme réduite (NADH) et la forme oxydée (NAD⁺). Cela inclut donc une compartimentation entre les métabolites libres et les protéines liées au NAD⁺ (Cambronne et Kraus 2020). De nombreuses enzymes dépendantes du NAD⁺ sont retrouvées localisées dans le noyau et le cytoplasme. Ces enzymes sont présentes dans ces compartiments afin d'être directement prêtes à être régulées par les fluctuations subcellulaires du métabolite libre (Ryu et al. 2018). Pour les enzymes utilisant le NAD⁺ comme cofacteur (et donc consommatrices) la biodisponibilité du NAD⁺ et des signaux de stimulation peuvent fonctionner comme 2 « vérins ». Ces 2 contrôles sont donc nécessaires pour induire l'activité catalytique de l'enzyme. Le NAD⁺ sous forme libre représente donc une balance entre la synthèse et la consommation locales du cofacteur. Bien

que le NAD^+ dérive de l'oxydation du NADH , ce mécanisme impacte moins les concentrations en NAD^+ libres au niveau nucléaire et cytoplasmique que le mécanisme de synthèse (Cambronne et Kraus 2020). On retrouve donc d'avantage de molécules de NAD^+ que de NADH dans le noyau et le cytoplasme. En effet, on estime retrouver un ratio NAD^+/NADH de 400 pour 1 dans le noyau, de 700 pour 1 dans le cytoplasme et de 5 à 10 pour 1 dans la mitochondrie (Dölle et al. 2010).

IV. Compartimentation du cycle des folates

Le tétrahydrofolate (THF) est une vitamine B soluble formée de 3 parties chimiques distinctes : un anneau ptérine, un groupe p-aminobenzoyl et une chaîne polyglutamique (Froese, Fowler, et Baumgartner 2019). Ce sont les groupements glutamate formant la chaîne polyglutamique qui sont responsables de la rétention de la vitamine B9 à l'intérieur de la cellule. Ils permettent aussi d'augmenter l'affinité du THF pour les enzymes dépendantes des folates. Il a été montré depuis peu qu'une canalisation métabolique peut être nécessaire pour prévenir la dégradation oxydative des cofacteurs de folates comme le THF, le dihydrofolate (DHF) ou encore le 10-formyltétrahydrofolate (10-formylTHF) qui sont chimiquement labiles et donc susceptibles de subir une dégradation oxydative irréversible. En effet, il a été montré qu'en absence de composés réduits, le THF a une durée de vie de quelques minutes (Zakrzewski 1966). Les folates ont montré qu'ils peuvent stabilisés et protégés de la dégradation oxydative en se liant à des protéines induisant une élimination de la diffusion des folates. De plus, la canalisation métabolique des enzymes dépendantes des folates peut être prédite en estimant les concentrations cellulaires en folates comparées à la capacité de liaison des folates cellulaires totaux (Stover et Field 2011).

Le métabolisme des folates a été retrouvé dans différents compartiments cellulaires qui sont principalement le cytoplasme et la mitochondrie. Une petite proportion a été retrouvée dans les lysosomes où les polyglutamates sont convertis en monoglutamates par la γ -glutamyl hydrolase (Panetta et al. 2002). En ce qui concerne le métabolisme retrouvé dans le cytoplasme, les folates y ont 3 devenirs possibles : la synthèse *de novo* des bases purines et pyrimidines, la reméthylation de l'homocystéine en méthionine via la méthionine synthase et la conversion de la sérine en glycine. La vitamine B9 est un médiateur clé du métabolisme des monocarbones. Cependant, ce dernier peut aussi être issu du catabolisme de l'histidine, des purines ou encore de la sérine dans le cytoplasme (Fox et Stover 2008).

A. Compartimentation du métabolisme des folates dans la mitochondrie

Le compartiment mitochondrial représente plus de 40% des folates cellulaires totaux (Lin, Huang, et Shane 1993). Les folates sont transportés et entrent dans la mitochondrie sous forme de folates monoglutamates (MG-F) grâce au transporteur mitochondrial des folates réduits (RFC) appelé SLC25A32. Le pool de folates polyglutamates (PG-F) mitochondriaux est un pool distinct de celui retrouvé dans le cytoplasme (Lin, Huang, et Shane 1993). Dans la

mitochondrie, le métabolisme des folates peut permettre la synthèse du formate à partir du fMet-tRNA et du 10-formylTHF (Tibbetts et Appling 2010).

B. Compartimentation du métabolisme des folates dans le cytoplasme et le noyau

Sachant que le métabolisme des folates peut conduire à 3 devenir possibles, il existe donc une compétition pour les cofacteurs folates. C'est le 5,10-méthylèneTHF qui subit la principale compétition entre la synthèse *de novo* des dTMP et la reméthylation de l'homocystéine. De plus, il existe des variants génétiques du gène *MTHFR* codant la protéine MTHFR induisant une diminution de l'activité de la protéine et donc augmentant la biosynthèse *de novo* des dTMP (Quinlivan et al. 2005). Les biosynthèses *de novo* des bases purines et pyrimidines sont transitoirement isolées des autres voies de signalisation dépendantes des folates. Il existe donc une dynamique physique de compartimentation ainsi que la formation d'un métabolon.

V. Compartimentation nucléaire et régulation épigénomique et épigénétique

A. Variation des voies métaboliques en fonction des besoins cellulaires en nutriments

Les métabolismes intracellulaires et donc les voies métaboliques qui en découlent sont responsables de la conversion des nutriments extracellulaires, provenant de l'alimentation, comme le glucose, les acides gras, les acides aminés provenant des protéines et les vitamines, en métabolites actifs intracellulaires. Il est établi depuis quelques années qu'il existe un lien fort entre le métabolisme intracellulaire, et plus particulièrement le métabolisme compartimenté dans le noyau, et la régulation épigénomique et épigénétique. En effet des modifications des besoins cellulaires requièrent une reprogrammation métabolique en augmentant ou en diminuant la biosynthèse de métabolites spécifiques (Boon, Silveira, et Mostoslavsky 2020). Par exemple, une des adaptations métaboliques les plus connues est l'acquisition de la glycolyse aérobie plus connu sous le nom de « l'effet Warburg ».

Concernant le cycle des monocarbone et l'impact de ce métabolisme sur les modifications épigénétiques, les donneurs universels de monocarbone et de di-carbone à savoir la SAM et l'acétyl-CoA sont respectivement nécessaires pour les méthylations et les acétylations de la chromatine. En effet, une augmentation ou une diminution du taux de ces « métabolites énergétiques » affectent l'épigénome (Gut et Verdin 2013). Il a été montré dans la littérature qu'une restriction alimentaire en méthionine et donc en donneurs de groupements méthyles affectait la méthylation de l'ADN et des histones induisant par conséquent des modifications épigénétiques et épigénomiques (Mattocks et al. 2017). De plus, il est connu que cette restriction durant la gestation et l'allaitement est responsable de l'induction du concept de programmation fœtale chez la descendance induisant des petits poids à la naissance mais aussi des déficits neurocognitifs et/ou locomoteurs (J.-L. Guéant et al. 2014). Un autre exemple de la restriction en méthionine a été étudiée dans la physiopathologie du cancer. En effet, une diminution de la marque d'histone H3K4me3 induit une diminution de l'expression

des gènes associés au cancer comme *MYC*, *MAPK* ou *AKT1* et induit une augmentation de l'expression des gènes activant les lymphocytes T helper et les macrophages (Roy et al. 2020).

B. Chromatine et enzymes métaboliques

Depuis environ 20 ans, une grande variété de modificateurs de la chromatine ont été mis en évidence comme impliqués dans la régulation de l'expression des gènes (S. Zhao, Allis, et Wang 2021). Le métabolisme cellulaire émerge maintenant comme second participant de la régulation. Alors que les « writers », « readers » et « erasers » induisent les marques épigénétiques, leur activité est fortement dépendante de la biodisponibilité en métabolites (Boon 2021). Les modificateurs de la chromatine peuvent chimiquement altérer les histones, l'ADN et les ARN pour modifier la structure de la chromatine, ajuster l'accessibilité aux éléments génétiques et déterminer la stabilité des transcrits. Les modifications de la chromatine les plus connues sont les méthylations, les acétylations et les phosphorylations. Cependant, depuis quelques années, d'autres modifications ont été mises en lumière et touchent plus particulièrement les histones : les lactylations, les β -N-acetylglucosaminylations et les acylations (Gut et Verdin 2013). Ces modifications sont liées à des dépôts ou des suppressions de marques dépendantes de la production de métabolites qui agissent comme substrats, cofacteurs ou répresseurs de ces modificateurs de la chromatines (Boon 2021).

Dans ce contexte, la chromatine apparaît comme une connexion entre les métabolismes et la régulation épigénétique. Les marques de la chromatine sont des modifications chimiques sur les histones ou sur l'ADN lui-même, qui déterminent l'accessibilité au recrutement de la machinerie de transcription ainsi que la condensation de la chromatine (Stillman 2018). En général, la méthylation de l'ADN est associée à une inhibition de la transcription et à une compaction de la chromatine, alors que l'acétylation des résidus lysines des histones est associée à une activation de la transcription (Gut et Verdin 2013). La méthylation des histones peut quant à elle être associée à une promotion ou à une répression de la transcription ; ce processus dépendant du résidu lysine spécifiquement modifié. Les modificateurs de la chromatine qui sont recrutés afin d'ajouter ou d'enlever des marques ont des activités dépendant fortement de la biodisponibilité en métabolites. Cela montre donc le lien fort entre activité métabolique et modifications épigénétiques (Boon, Silveira, et Mostoslavsky 2020). Il a par exemple été montré par l'équipe de Morris en 2019, que le niveau intracellulaire en α -cétoglutarate contrôlait l'expression d'une centaine de gènes et qu'une accumulation du taux de ce métabolite dans les tumeurs déficientes en p53 pouvait induire la différenciation cellulaire et antagonisant la progression tumorale (Morris et al. 2019). Les métabolites sont donc capables d'induire des modifications de la chromatine (Gut et Verdin 2013).

Dans ce contexte, le métabolisme nucléaire semble donc apparaître comme un contrôleur local de la chromatine. D'après toutes les études citées précédemment, l'épigénome est donc fortement influencé par la biodisponibilité en métabolites sachant que les marques épigénétiques sont vitales pour soutenir l'identité cellulaire. Par conséquent, il existe des systèmes permettant d'isoler le compartiment nucléaire afin de protéger l'épigénome des fluctuations métaboliques délétères qui se produisent en conditions physiologiques ou pathologiques. Deux systèmes de communication entre le cytoplasme et le noyau apparaissent donc comme particulièrement intéressants : la conversion métabolique directement dans le compartiment nucléaire ou la distribution des métabolites du cytoplasme vers le noyau via les pores nucléaires. La chromatine a récemment été identifiée comme « réservoir » de métabolites pouvant stocker les surplus ou les pools supplémentaires de métabolites en attente d'une fluctuation des besoins cellulaires. L'équipe de Ye a montré en 2017 chez la levure que les méthylations de H3K36 et de H3K79 induisent une rétention des groupements méthyles au niveau de ces zones après accumulation de la SAM, alors qu'en parallèle, cette accumulation peut être mobilisée pour soutenir la synthèse cytoplasmique des phospholipides (Ye et al. 2017) (*Figure 42*).

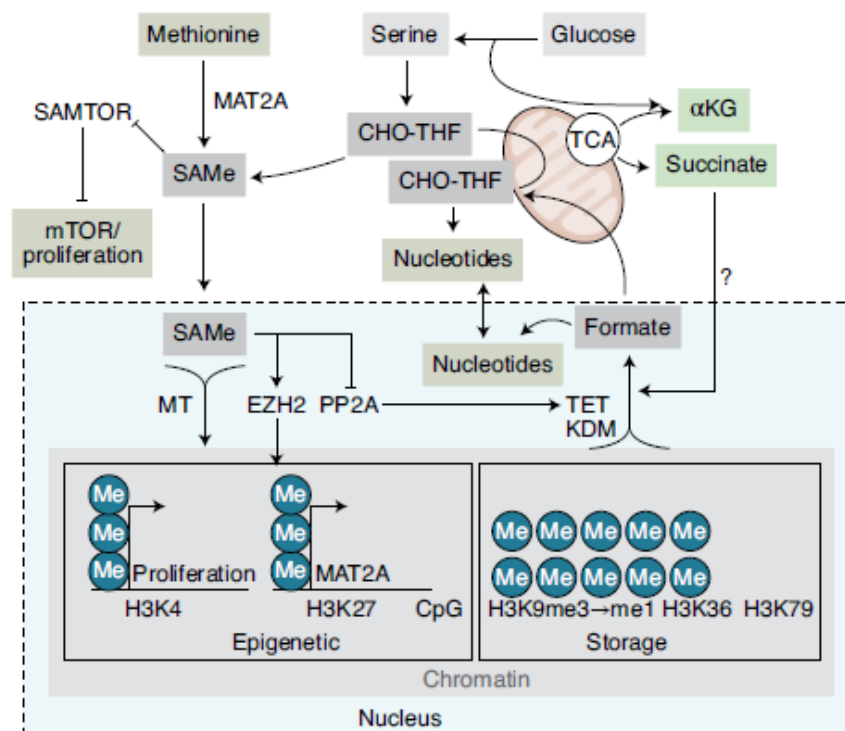


Figure 42 : Balance entre les donneurs de groupements méthyles.

Après une surproduction de SAM, l'activité des méthyltransférases nucléaires et les gènes impliqués dans la prolifération augmentent ce qui inhibe la production de SAM et induit un stockage des groupement méthyles sur la chromatine. Une pénurie de SAM freinera la prolifération et mobilisera les groupement méthyles sur la chromatine libérant ainsi le formate permettant ainsi de maintenir l'homéostasie cellulaire. TCA, cycle de l'acide tricarboxylique.

(Boon, Silveira, et Mostoslavsky 2020)

Un des mécanismes qui pourrait contrôler les métabolismes nucléaires serait l'importation sélective d'enzymes métaboliques. Cette importation se produit en combinant l'activité des pores nucléaires et des protéines de transport reconnaissant des signaux de localisation

nucléaires, masqués ou non par des signaux de modifications post-traductionnelles. Par conséquent, la régulation transcriptionnelle des enzymes spécifiques du noyau et le contrôle des signaux de localisation nucléaire pourraient réguler l'activité des enzymes métaboliques (Christie et al. 2016). Les enzymes impliquées dans le métabolisme de l'acétyl-CoA sont, par exemple, régulées de cette manière. En effet, l'enzyme ACSS2 (acétyl-CoA synthetase short-chain family member 2) peut être transloquée dans le noyau afin de générer ou de recapturer l'acétyl-CoA pour maintenir l'acétylation des histones. Cette translocation peut être conduite par des phosphorylations dépendantes des AMPK. De plus, il est connu qu'une augmentation nucléaire du taux d'acétyl-CoA induit une acétylation spécifique de *loci* impliqués dans la prolifération cellulaire, la fluctuation du flux glycolytique ou encore la synthèse d'acides gras (Cai et al. 2011). En conséquence, les enzymes nucléaires ont non seulement un rôle de régulation nucléaire des métabolismes, mais aussi un rôle de coordination de l'activité des voies métaboliques dans les autres compartiments.

Un autre métabolisme connu pour avoir une action nucléaire est le métabolisme du NAD⁺. En effet, ce métabolisme peut régir l'import nucléaire des enzymes métaboliques et contrôler la transcription. Le premier niveau de compartimentation correspond à la localisation différentes enzymes dépendantes du NAD⁺ à savoir les sirtuines. La localisation distincte de ces différentes déacétylases affecte les niveaux de groupement acyle et de NAD⁺ dans les différents compartiments (*Figure 43*).

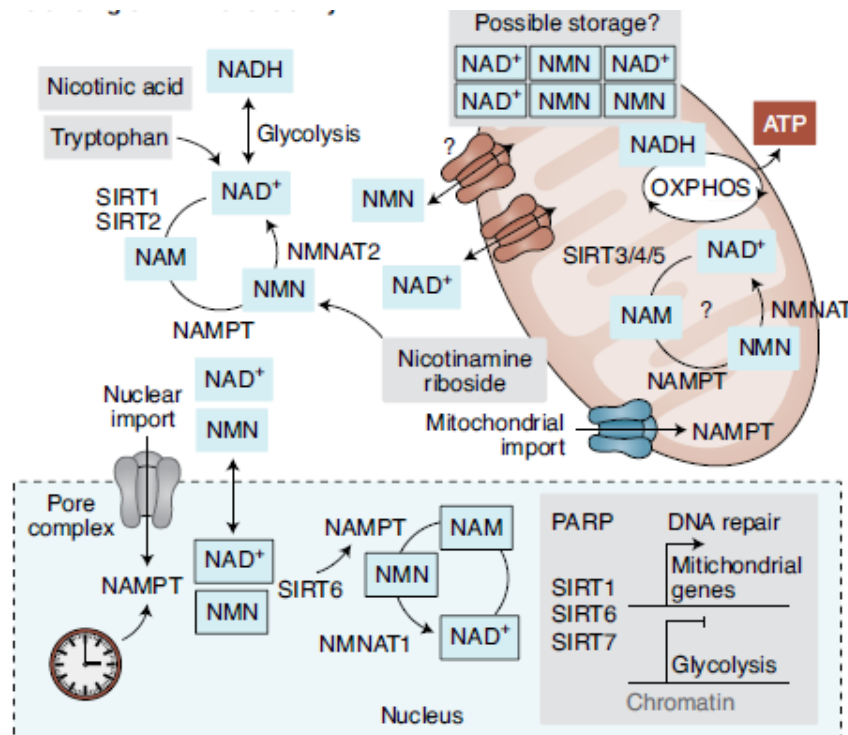


Figure 43 : Compartimentation du métabolisme du NAD⁺ et impact des sirtuines.

SIRT1 et 6 modulent le métabolisme énergétique en impactant l'état nutritionnel et la reprogrammation métabolique. SIRT6 module aussi le métabolisme glycolytique comme « silencer » des gènes glycolytiques en réponse à la disponibilité en glucose.

(Boon, Silveira, et Mostoslavsky 2020)

Cependant, quelques marques de méthylation comme H3K4me3 et H3K36me3 sont associées à l'activation des promoteurs et induisent donc la transcription. De plus, toutes les méthyltransférases utilisent une molécule de S-adenosyl-méthionine (SAM) afin de méthyler leurs cibles. Cela montre donc une forte corrélation entre la capacité de méthylation de la cellule et le ratio SAM/SAH qui est aussi connu sous le nom d'index de méthylation. Ce ratio est donc étroitement lié avec la biodisponibilité du précurseur de la SAM à savoir la méthionine.

Si la cellule se retrouve dans un contexte de production de SAM supérieure aux besoins cellulaires, l'histone méthyltransférase EZH2 utilisera la SAM afin de déposer une marque inhibitrice sur H3K27me3 sur les promoteurs des gènes impliqués dans la génération de la SAM (formant ainsi une sorte de rétrocontrôle négatif) (Dann et al. 2015). Dans le cas contraire, si la production de SAM est inférieure aux besoins cellulaires, la méthyltransférase METTL16 n'est plus capable de méthyler l'ARN de MAT2A induisant donc son accumulation et une augmentation de la traduction et de la production de l'enzyme aboutissant *in fine* à une augmentation de la production de SAM (Pendleton et al. 2017) (Figure 44).

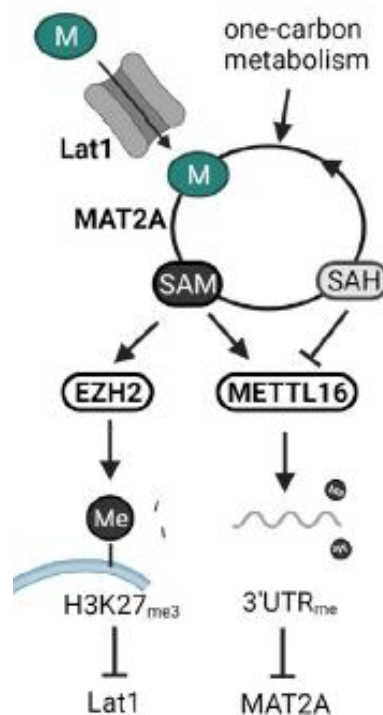


Figure 44 : La méthylation épigénétique modulée par les niveaux intracellulaires de SAM nécessaires dans les réactions de méthylation.

La méthylation épigénétique équilibre les niveaux intracellulaires de SAM nécessaires aux réactions de méthylation. L'excès de SAM induit la régulation à la baisse du transporteur de méthionine Lat1 par le biais d'un silencing médié par EZH2 (histone méthyltransférase). Les faibles niveaux de SAM sont rétablis par l'incapacité de METTL16 (méthylase de l'ARN) de méthyler l'ARNm des méthionine adénosyl transférase (MATs) ce qui entraîne une augmentation de la traduction.

(Boon 2021)

Dans le noyau, comme dans les autres compartiments, la formation des complexes multienzymatiques métaboliques dépend du flux métabolique local mais aussi des modifications et donc des acteurs modifiant la chromatine. En effet, il a été montré en 2015 par l'équipe de Li, qu'il existe chez la levure un complexe faisant le lien entre des enzymes réalisant la glycolyse, impliquées dans la synthèse de sérine ou encore dans la biosynthèse de la SAM, mais aussi des histones méthyltransférases et phosphorylases. Ce complexe nommé SESAME contient donc des enzymes responsables de la production locales d'ATP, de SAM et d'acétyl-CoA. Les interactions de ces enzymes métaboliques avec des méthyltransférases et des phosphorylases induisent une modulation de la méthylation, de l'acétylation et de la phosphorylation de régions métabolique spécifiques (S. Li et al. 2015) (*Figure 45*).

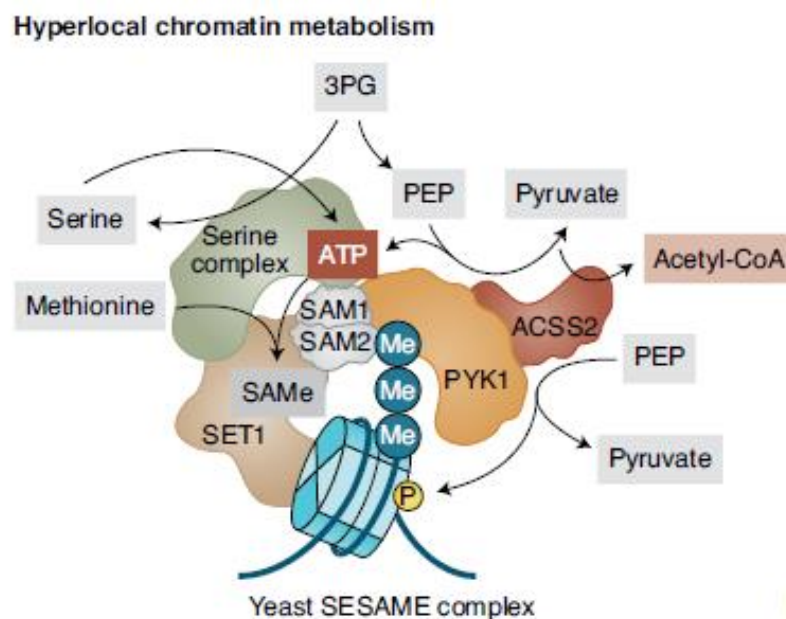


Figure 45 : Complexe enzymatique SESAME chez la levure.

Dans le noyau comme dans les autres compartiments, les enzymes métaboliques forment des complexes multienzymatiques qui augmentent l'efficacité du flux métabolique et guident la conversion métabolique vers certaines modifications de la chromatine. Chez la levure, un grand complexe (SESAME) relie les enzymes de la glycolyse, de la biosynthèse de sérine et de SAM à une histone méthyltransférase (SET1) et une histone phosphorylase (PYK1)

(Boon, Silveira, et Mostoslavsky 2020)

De plus, en 2017 une étude a mis en évidence, cette fois-ci dans des cellules de mammifères et dans des hippocampes de souris adultes, que l'acyl-coenzyme A synthétase (ACSS2 : responsable de la production d'acétyl-CoA) se trouve dans le noyau. Cette localisation nucléaire permet à l'enzyme d'interagir avec les histones acétyltransférases induisant donc une régulation de l'acétylation de gènes spécifiques impliqués dans le développement de l'hippocampe mais aussi servant de stock de substrat affectant la capacité de mémoire à long terme en modulant l'expression de régions géniques spécifiques (Mews et al. 2017) (*Figure 46*).

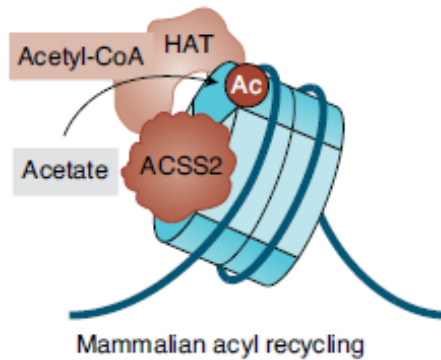


Figure 46 : Interaction entre l'acyl-coenzyme A synthétase et des histones acétyltransférases.

Chez les mammifères il a été découvert un autre complexe (ACSS2) permettant d'alimenter l'histone acétyltransférase (HAT) directement au niveau nucléaire.

(Boon, Silveira, et Mostoslavsky 2020)

Toutes ces données indiquent donc que les enzymes modifiant la chromatine et les enzymes métaboliques modulent la concentration en métabolites *loci*-spécifiques et que cette régulation du métabolome nucléaire est plus complexe qu'une simple diffusion des métabolites du compartiment cytoplasmique vers le compartiment nucléaire.

C. Métabolisme nucléaire et homéostasie cellulaire

Même si le métabolisme nucléaire apparaît comme un réseau isolé, les métabolismes nucléaires, cytoplasmiques et mitochondriaux restent tout de même liés. En effet, il est connu que l'activité mitochondriale est fortement impactée par l'âge via la perte de l'homéostasie cellulaire. Depuis longtemps, il existe donc un débat scientifique pour savoir pourquoi l'homéostasie mitochondriale est touchée en premier. Comme mentionné précédemment, un des métabolismes qui est bien connu pour être compartimenté est le métabolisme du NAD^+ . Il a été montré dans la littérature qu'au cours du vieillissement, une diminution de l'activité de ce métabolisme au niveau nucléaire induit une diminution de la synthèse de NAD^+ induisant par conséquent une diminution de HIF1 α et de SIRT1. Cette diminution de HIF1 α et SIRT1 induit par la suite une diminution de la phosphorylation oxydative dans la mitochondrie (Gomes et al. 2013). D'autre part, les cellules sont capables de reprogrammer leur métabolisme et l'expression des gènes en réponse à la dynamique de l'environnement nutritif. En effet, des changements dans les apports en micronutriments comme les carbohydrates ou les acides aminés ou en micronutriments clés comme l'acétyl-CoA, peuvent induire des signaux intrinsèques conduisant à l'adaptation par reconfiguration génétique de la cellule. Dans ce contexte, une équipe a publié une étude montrant que les espèces méthylées pouvaient être mobilisées dans le noyau en réponse à une demande cellulaire pour former la SAM et plus spécifiquement dans le cas de la synthèse des phospholipides comme la phosphatidylcholine (Ye et al. 2017). Ces observations suggèrent donc qu'un problème de balance entre le compartiment nucléaire et les compartiments non-nucléaires peut induire l'apparition de pathologies.

La méthylation de l'ADN et des histones est elle aussi déterminée par l'activité d'enzymes métaboliques retrouvées au niveau nucléaire. En effet, il a été montré que la sous-unité MAT α 2 (sous-unité catalytique de l'enzyme méthionine-adosyltransférase MAT II) était présente dans le noyau. La présence de MAT α 2 aurait pour but de générer de la SAM au niveau nucléaire pour les méthyltransférases afin de réprimer les gènes cibles de MafK (Kato et al. 2011a). De plus il a aussi été montré que le métabolisme de la SAM était fortement lié à l'enzyme SAHH qui est responsable de l'hydrolyse de la SAH, l'inhibiteur compétitif des méthyltransférases. Cette enzyme a elle aussi été retrouvée au niveau nucléaire et serait impliquée dans la régulation de l'horloge circadienne (Greco et al. 2020).

Il a été montré dans la littérature que le tissu hépatique contenait 60 nmol de SAM par gramme de tissu qui sont répartis dans différents compartiments cellulaires avec 20 nmol dans le cytoplasme, 10 nmol dans les mitochondries et 0,2 nmol par gramme de tissu dans le noyau. La question fondamentale est de savoir si la SAM constitue un seul pool dans les compartiments cytoplasmique et nucléaire. D'un point de vue simpliste, la SAM pourrait être synthétisée par les MATs cytoplasmiques puis fournie aux méthyltransférases nucléaires par diffusion. Un tel mécanisme est simple mais semble manquer de capacité de régulation. Il semble difficile d'équilibrer les besoins en SAM dans le noyau alors qu'elle est synthétisée ailleurs (Igarashi et Kato 2013). De plus, aucun mécanisme d'import de la SAM au niveau nucléaire n'a été décrit à ce jour.

D. Influence du métabolisme des monocarbones sur la régulation épigénomique

Le métabolisme des monocarbones et plus particulièrement le cycle de la méthionine est un métabolisme critique pour de nombreux processus biochimiques incluant le métabolisme des acides aminés et la capacité de méthylation cellulaire. En effet, ce métabolisme permet la production du donneur universel de groupement méthyle qui est la SAM mais aussi de l'inhibiteur compétitif de méthyltransférase qui est la SAH. Des problèmes de régulation dans le cycle de la méthionine induisent une augmentation des concentrations en homocystéine qui est un important facteur de risque des maladies cardiovasculaires, du diabète de type II, de l'ostéoporose et de diverses pathologies neurologiques (Jensen et al. 2014).

La méthylation est un processus essentiel qui peut affecter comme nous l'avons vu dans cette introduction, l'ADN, l'ARN, les histones, les protéines ou encore les phospholipides. Le groupement méthyle provenant de la SAM sera responsable de la méthylation de ces diverses cibles et participera à la régulation de l'expression des gènes, à l'activation et à la stabilisation de ces différentes molécules. Il a été mis en évidence que l'homocystéine n'est pas la seule responsable du développement de pathologies mais aussi la SAH. En effet, il a été montré qu'une accumulation de SAH était associée à des problèmes cardiaques, à l'inflammation, au diabète ou encore aux maladies rénales chroniques (Fang et al. 2014). En général, une hypométhylation de l'ADN et des différents promoteurs sont les caractéristiques de la tumorigénèse avec des hypométhylations retrouvées dans le cancer colorectal ou du sein. De plus, l'accumulation de SAH est associée à l'athérosclérose via l'inactivation de DNMT1, la

suppression de la transcription et l'hypométhylation du promoteur de la cycline A (Jamaluddin et al. 2007).

La méthylation des protéines affecte les interactions protéine-protéine, les propriétés membranaires, la structure et la fonction de la chromatine et par conséquent l'expression des gènes. En effet, une altération de la méthylation des histones H3 et H4 est responsable du développement de cancers, de maladies neurodégénératives et de maladies cardiovasculaires via un problème de remodelage de la chromatine (Gut et Verdin 2013). De plus, il est connu qu'une restriction en méthionine (une diminution de 10 à 25 μM) impacte aussi la méthylation des histones (Mentch et al. 2015). La méthylation des protéines non-histones régule la localisation subcellulaire et la stabilité protéique. En effet, la méthylation de la partie C-terminale des protéines augmente l'hydrophobicité et la capacité aux protéines à se lier aux membranes (Clarke et Tamanoi 2004).

La méthylation des ARN est un processus réversible qui affecte la stabilité des ARN. Des problèmes de méthylation des ARN on encore l'accumulation d'homocystéine sont responsables de l'augmentation de ICAM-1 dans les cellules endothéliales ce qui est associée à des risques cardiovasculaires (Luo et al. 2016). De plus, il est également reporté qu'un défaut de SAM induit par une carence alimentaire en donneurs de méthyles (B9 et B12) pouvait induire une réduction du niveau de méthylation m6A (Mosca, Leheup, et Dreumont 2019). Enfin, la méthylation des phospholipides est un processus hautement important dans de nombreuses fonctions physiologiques. En effet, la méthylation de la PE permet de synthétiser de la PC. La PE est impliquée dans la rigidité et la viscosité des membranes cellulaires (Ye et Tu 2018). Une inhibition de la méthylation de la PE est responsable d'une diminution de la sécrétion des VLDL ayant donc un impact direct sur la production de lipoprotéines ou encore sur le transport des triglycérides (Nishimaki-Mogami, Suzuki, et Takahashi 1996).

Une étude de 2020 s'est focalisée sur l'accumulation de SAH dans le développement de diverses pathologies. Les auteurs ont mis en évidence que l'accumulation de SAH est un senseur métabolique responsable de la méthylation dépendante de la SAM et que le cycle de la méthionine est un système senseur métabolique contrôlant la méthylation dans de nombreux processus pathologiques. Cette étude a mis en lumière qu'une accumulation de SAH diminuait le potentiel de méthylation cellulaire induisant une hypométhylation de l'ADN et/ou des protéines contribuant à des problèmes de réparations vasculaires et de l'inflammation observée dans des maladies métaboliques. De plus, ils ont mis en évidence que seule la CBS avait, en plus de sa localisation cytoplasmique, une localisation nucléaire indiquant que la clairance nucléaire en homocystéine est essentielle dans la protection du génome (Shen et al. 2020a) (*Figure 47*).

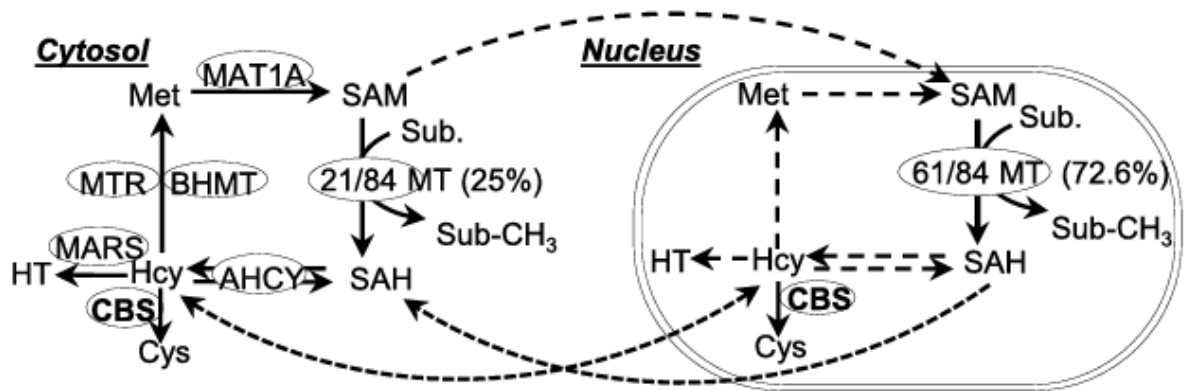


Figure 47 : Hypothèse de transfert de SAM, SAH et homocystéine entre le cytoplasme et le noyau.

Toutes les enzymes essentielles du cycle métabolique des monocarbone sont situées dans le cytoplasme. 21 méthyltransférases sur 84 sont retrouvées dans le cytoplasme et la majorité (72,6 %) sont retrouvées dans le noyau. Certains processus métaboliques ne sont pas actifs dans le noyau car leurs enzymes n'y sont pas identifiées et sont indiquées par des lignes en pointillées.

(Shen et al. 2020a)

Pris dans leur ensemble ces données montrent donc la présence de nombreuses enzymes métaboliques au niveau nucléaire en plus de leur localisation cytoplasmique (CBS et SAH). De plus, aucun transporteur ou système d'import des différents métabolites vers le noyau n'a été décrit à ce jour. Ces données suggèrent donc l'existence d'un cycle entier de la méthionine au niveau nucléaire afin de permettre une synthèse localisée des différentes intermédiaires.

Hypothèse et objectifs

I. Une utilisation préférentielle de la SAM produite *de novo* ?

Les données de la littérature et les propres résultats du laboratoire ont pu mettre en évidence qu'un déficit nutritionnel ou des mutations génétiques touchant le métabolisme des monocarbone conduisent à une diminution de la synthèse de méthionine et du potentiel de méthylation ce qui aboutit *in fine* à des altérations épigénomiques. Cependant, la méthionine cellulaire ne provient pas uniquement du cycle de la méthionine mais aussi du catabolisme des protéines et de l'alimentation. En effet, les animaux carencés en vitamines B9 et B12 tout comme les cellules de patients utilisées en culture ne sont pas carencés en méthionine mais présentent une diminution de l'index de méthylation SAM/SAH (J.-L. Guéant et al. 2022b). Cela montre donc que la méthionine exogène n'est pas suffisante pour compenser les troubles du métabolisme des monocarbone. Toutes ces données indiquent une utilisation préférentielle de la méthionine produite *de novo* pour la synthèse de SAM.

II. Interactome de la méthionine synthase et production locale de métabolites ?

Mais comment pourrait-on expliquer cette utilisation préférentielle de la méthionine produite *de novo* pour la synthèse de SAM ? De nombreux exemples indiquent que les interactions protéine-protéine peuvent conduire à la production locale de métabolites et à la canalisation du substrat. En effet, plusieurs études ont mis en évidence des interactions entre les MATs et des méthyltransférases permettant la synthèse locale de SAM à l'endroit où la SAM est utilisée. On observe un processus similaire lors de la production locale du NAD⁺ permettant son utilisation à l'endroit où l'activité désacétylase de SIRT1 est requise, soit au niveau des promoteurs (T. Zhang et al. 2009). C'est pourquoi le rôle crucial de l'activité de la méthionine synthase dans la synthèse de SAM suggère une utilisation préférentielle de la méthionine produite *de novo*, qui pourrait être le résultat d'une production locale des métabolites impliqués dans la synthèse de la SAM, ce qui implique une localisation nucléaire de la méthionine synthase et donc l'existence de nouvelles interactions protéine-protéine encore non identifiées.

Dans le contexte du métabolisme de la vitamine B12, d'autres interactions protéine-protéine sont particulièrement intéressantes pour la synthèse de SAM. En effet, une étude de 2013 a mis en évidence des liens étroits entre la sous-unité régulatrice MAT β de MAT II, la protéine liant les ARNm (RBP) HuR et la désacétylase SIRT1 (Yang et al. 2013a). De plus, le laboratoire a montré que les dysfonctionnements du métabolisme de la vitamine B12 conduisent à une localisation aberrante de HuR (Battaglia-Hsu et al. 2018) induisant une diminution de l'expression de SIRT1 (Garcia et al. 2011). En supplément, cette étude de 2013 a montré que l'activation de SIRT1 par le resvératrol ou la surexpression de SIRT1 ou de HuR conduisent à

une diminution des interactions entre MAT β et MAT α 2, ce qui augmente la synthèse de SAM (Yang et al. 2013a). Pris dans leur ensemble ces résultats suggèrent donc que dans le contexte des altérations du métabolisme de la vitamine B12, les perturbations de HuR et la diminution de l'expression de SIRT1 pourraient contribuer à la diminution de la synthèse de SAM.

Parmi ces interactions, celles impliquant SIRT1 et des sous-unités de MAT II suggèrent aussi que l'activation pharmacologique de SIRT1 par le SRT2104 (un activateur pharmacologique déjà testé au laboratoire), pourrait conduire à l'augmentation de la synthèse de SAM.

L'objectif global de ce projet est de répondre à la question suivante : pourquoi la régulation épigénomique de l'expression des gènes dépend de l'activité de la méthionine synthase ? Par conséquent, ce travail a pour but de comprendre comment est régulée la méthylation cellulaire. En effet, comme mentionné en introduction, la méthylation est dépendante de la présence de SAM. Or, aucun système d'import ou de transport vers le noyau de SAM n'a été identifié. De plus, de nombreuses enzymes du métabolisme des monocarbones et par conséquent du cycle de la méthionine ont été retrouvées dans le noyau en plus de leur localisation cytosolique. Partant de ces observations, il paraît très probable qu'il existe un système de production nucléaire de SAM avec une régulation fine de la localisation de ces enzymes, ce qui serait un avantage fonctionnel pour l'organisme. Nous nous sommes particulièrement intéressés aux mécanismes responsables du rôle préférentiel de la méthionine synthétisée *de novo* dans la synthèse de SAM et au rôle de la méthionine synthase et de son interactome élargi dans la production de SAM dans le noyau des cellules CblG déficientes en MS comparées aux fibroblastes contrôles (WT).

Afin de réaliser cet objectif, le sujet de thèse a été organisé en 4 parties complémentaires :

1. La première partie du projet a eu pour but d'étudier la localisation subcellulaire de la méthionine synthase et de toutes les enzymes du cycle de la méthionine dans des cellules HepG2, des fibroblastes contrôles et de patients CblG, CblC et CblE.
2. La seconde partie du projet a eu pour but de mesurer les métabolites du cycle de la méthionine dans les fractions cytoplasmiques et nucléaires des cellules HepG2, des fibroblastes contrôles et de patients CblG. De plus dans cette partie, nous étudions l'activité méthionine synthase via l'étude de l'incorporation *in vitro* et *in cellulo* de métabolites marqués par des isotopes stables (deutérium) ou radioactifs (^{14}C) en fonction du compartiment cellulaire dans des cellules HepG2, des fibroblastes contrôles et de patients CblG.
3. La troisième partie du projet avait pour but d'identifier les interactions protéine-protéine impliquant la méthionine synthase en fonction du compartiment subcellulaire dans des cellules HepG2, des fibroblastes contrôles et de patients CblG.
4. La quatrième partie du projet portait sur l'étude des effets de l'activation pharmacologique de SIRT1 par le SRT2104 sur la synthèse de SAM via la modulation des interactions protéine-

protéine impliquant MAT α 2, MAT β et SIRT1 dans des extraits protéiques totaux de cellules HepG2, de fibroblastes contrôles et de patients CblG.

Résultats

Partie 1 : Localisation nucléaire de la méthionine synthase et des enzymes du cycle de la méthionine

La détermination de la localisation subcellulaire des différentes enzymes du cycle de la méthionine a été réalisée par diverses méthodes. Dans un premier temps nous nous sommes concentrés sur la mise au point d'une méthode de fractionnement subcellulaire afin de séparer les protéines cytoplasmiques des protéines nucléaires de nos diverses lignées cellulaires. Dans un second temps, nous avons exploré l'expression cytoplasmique et nucléaire de toutes les enzymes du cycle de la méthionine puis nous avons confirmé ces résultats par microscopie confocale (immunofluorescence et Duolink® Proximity Ligation Assay). Pour toutes nos analyses nous avons utilisé des cellules HepG2, des fibroblastes contrôles (WT), des fibroblastes de patient CblG caractérisés par des mutations du gène *MTR* codant pour la méthionine synthase et induisant une protéine possédant une activité enzymatique résiduelle, des fibroblastes de patient CblC caractérisés par des mutations du gène *MMACHC* codant MMACHC et des fibroblastes de patient CblE caractérisés par des mutations du gène *MTRR* codant la méthionine synthase réductase. Ces trois lignées de patients ont été utilisées car les protéines qui y sont absentes ou inactives sont connues pour être impliquées dans l'interactome de la méthionine synthase et induisent une diminution de l'activité enzymatique de la MS. Les cellules HepG2 ont été utilisées car ce sont des cellules hépatiques exprimant donc les trois gènes codant les MATs. Ensuite, afin de conforter nos résultats d'une localisation subcellulaire de la MS au niveau nucléaire nous avons mis au point un plasmide exprimant la MS couplée à la GFP. Nous avons transfecté ce plasmide dans des cellules HEK293 et visualisé la localisation de la protéine de fusion par microscopie confocale. Enfin, dans cette partie nous détaillerons des résultats obtenus visant à expliquer la localisation nucléaire de la MS via des co-immunoprécipitations de la MS suivies de western blot contre des modifications post-traductionnelles pouvant être impliquées dans le transport du cytoplasme vers le noyau. Nous avons investigué *in silico* les potentielles interactions entre la MS et d'autres protéines grâce à différentes bases de données comme FpClass, BioGRID, HuRI, IntAct, STRING et BioPlex. Enfin nous avons utilisé diverses bases de données afin d'étudier la séquence du gène *MTR* pour voir s'il existe dans la séquence un signal d'import nucléaire pouvant expliquer la localisation nucléaire de l'enzyme.

I. Mise au point de la méthode de fractionnement subcellulaire

Afin de séparer les protéines cytoplasmiques des protéines nucléaires nous avons procédé à un fractionnement subcellulaire en utilisant le kit NE-PER® (ThermoFisher Scientific). Après séparation des protéines de chaque compartiment, nous avons procédé à un WES de vérification du fractionnement. Pour cela nous avons utilisé un marqueur cytoplasmique (α -tubuline) et un marqueur nucléaire (TBP : TATA Box Binding Protein). Chaque fraction, qu'elle soit cytoplasmique ou nucléaire, a été testée pour les deux marqueurs afin de vérifier que l'on détectait uniquement l' α -tubuline dans les fractions cytoplasmiques et uniquement la TBP

dans les fractions nucléaires. Cette vérification a ensuite été réalisée sur toutes les fractions qui ont été utilisées par la suite pour les expériences de co-immunoprécipitation.

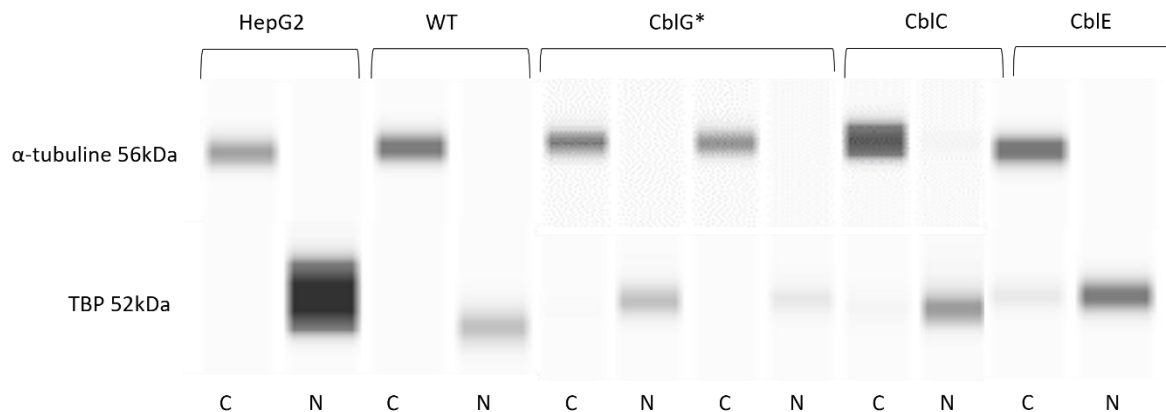


Figure 48 : Vérification de l'efficacité de fractionnement subcellulaire cytoplasme/noyau.

Les différentes fractions cytoplasmiques et nucléaires ont subi un WES contre l' α -tubuline (marqueur cytoplasmique) et la TBP (marqueur nucléaire) afin de vérifier le fractionnement réalisé par le kit NE-PER®. C = fraction cytoplasmique et N = fraction nucléaire. N=8

Dans l'ensemble nous avons pu obtenir un fractionnement très propre avec une absence de contamination cytoplasmique dans le noyau et inversement. Il est arrivé pour quelques fractions que l'on retrouve une légère contamination nucléaire dans le cytoplasme, mise en évidence par la présence de la TBP dans les fractions cytoplasmiques. Cette légère contamination ne gêne en rien nos analyses car la présence des enzymes du cycle de la méthionine est connue pour être cytoplasmique, donc un peu de protéines nucléaires ne gêne pas l'exploitation des résultats suivants (Figure 48). En revanche, nos analyses ont toujours montré que la fraction nucléaire ne contenait pas de contamination cytoplasmique.

II. Expression cytoplasmique et nucléaire des enzymes du cycle de la méthionine

Suite à la vérification de l'efficacité du fractionnement, nous nous sommes intéressés à l'expression cytoplasmique et nucléaire des enzymes du cycle de la méthionine à savoir, MS, MSR, les différentes MATs (MAT α 1, MAT α 2 et MAT β), MTHFR, CBS et SAHH par Western blot. Cette mesure d'expression a été réalisée sur les cellules HepG2 ainsi que sur les fibroblastes contrôles (WT), CblG, CblC et CblE. L' α -tubuline a été utilisée comme protéine de référence des fractions cytoplasmiques et la TBP comme protéine de référence des fractions nucléaires. Les western blots ayant été réalisés sur trois expériences indépendantes (réplicas techniques), l'étude densitométrique montre des variations importantes entre les réplicas et induit donc une absence de différence significative entre les lignées et uniquement des tendances (Figure 49 et 50). Les données ont été comparées par une analyse de variance en Two-Way ANOVA avec correction de Turkey et présentées sous la forme de moyenne \pm écart-type.

La méthionine synthase (MS) est présente dans le cytoplasme de toutes les lignées mais son expression est fortement diminuée dans les deux lignées CblG qui sont caractérisées par les mutations c.381delA (p.L128AfsX5) et c.2875G>A (p.V892V, fin exon 25) pour CblG1 et par une mutation c.609-1088G>A (p.A203EfsX13) retrouvée à l'état homozygote pour CblG2 induisant pour ces deux lignées la synthèse d'une protéine tronquée ou la dégradation des ARNm. La faible expression de la MS dans les cellules CblG est concordante avec une activité résiduelle de l'enzyme nécessaire à la viabilité cellulaire. Les niveaux d'expression de la MS sont similaires dans chaque compartiment subcellulaire. De plus, nous n'observons pas de différence significative dans le niveau d'expression de la MS dans les fractions nucléaires entre les CblG et les fibroblastes contrôles (WT).

Des travaux antérieurs au laboratoire ont mis en évidence dans des cellules CaCo2 que la protéine MS pouvait être retrouvée sous deux isoformes de 124 kDa et 144 kDa. La variation du rapport entre la forme de l'enzyme active à 140 kDa et la forme inactive à 124 kDa dépend de l'état prolifératif des cellules. C'est pourquoi une double bande correspondant à ces deux isoformes peut être observée suivant l'état prolifératif des cellules (*Figure 49A et 50A*). Dans les cellules CblG on observe principalement la forme non-active à 124 kDa mais on détecte tout de même une très faible bande à 144 kDa correspondant à une expression résiduelle de la protéine active. Concernant les fractions nucléaires, nous avons mis en évidence pour la première fois une localisation nucléaire de la MS dans toutes les lignées avec une absence de différence significative dans l'expression de la protéine entre les fibroblastes de patients et les contrôles (*Figure 49B et 50B*).

Par la suite nous nous sommes intéressés à l'expression de la méthionine synthase réductase (MSR) qui est un partenaire connu de la MS. Dans le cytoplasme, on peut observer la présence de la MSR dans toutes les lignées sauf les CblE qui sont caractérisés par une mutation faux sens c.7A>T induisant probablement une perturbation de l'épissage conduisant à l'absence de synthèse de la protéine MSR. Là aussi, nous avons mis en évidence pour la première fois que cette protéine pouvait être présente dans les fractions nucléaires de toutes les lignées, sauf là aussi chez les CblE (*Figure 49A, 49B, 50A et 50B*).

Les protéines suivantes impliquées dans le cycle de la méthionine sont les méthionine adénosyltransférases (MATs). Ces protéines étant formées par des assemblages de sous-unités catalytiques et régulatrices, nous avons étudié l'expression de la sous-unité catalytique MAT α 1, formant l'enzyme MAT I et MAT III uniquement présente dans le foie, la sous-unité catalytique MAT α 2 et la sous-unité régulatrice MAT β formant l'enzyme MAT II retrouvée de manière ubiquitaire dans l'organisme. Nous avons mis en évidence une localisation cytoplasmique mais aussi nucléaire de ces trois sous-unités dans toutes les lignées. MAT α 2 possédant deux sous-isoformes très proches, nous pouvons visualiser une double bande dans le Western blot (*Figure 49A à D et 50A à D*).

Ensuite, nous avons étudié l'expression de la SAH hydrolase (SAHH), de la cystathionine β -synthase (CBS) et de la méthylène tétrahydrofolate réductase (MTHFR) dans les fractions

nucléaires. Nous avons détecté toutes ces protéines dans les fractions nucléaires de toutes les lignées cellulaires sauf pour la CBS qui ne semble pas être exprimée dans les cellules HepG2 et fortement diminuée dans les fibroblastes CblE (*Figure 49E à H et 50E à H*). Nous avons donc démontré la localisation nucléaire de toutes les enzymes impliquées dans le cycle de la méthionine. Nous avons, de plus, observé un faible signal pour MTHFR dans les fractions nucléaires de toutes les lignées cellulaires.

Pris dans leur ensemble, ces résultats mettent en lumière une toute nouvelle localisation pour la MS et d'autres enzymes du cycle de la méthionine suggérant donc la présence d'un cycle de la méthionine actif au niveau nucléaire.

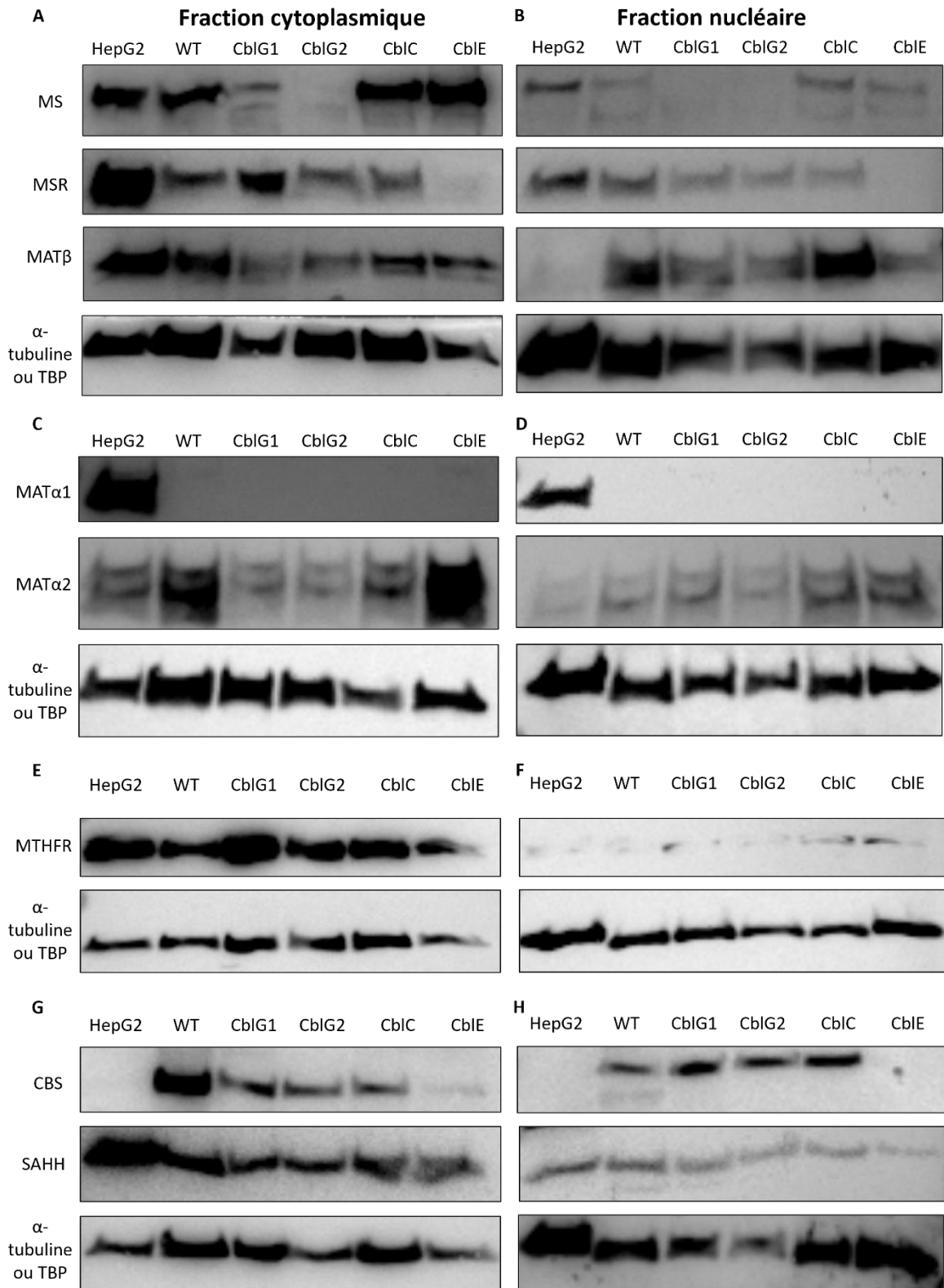


Figure 49 : Expression de MS, MSR, MAT α 1, MAT α 2, MAT β , MTHFR, CBS et SAHH dans les fractions cytoplasmiques et nucléaires.

Western blots réalisés en trois répliques techniques indépendants sur MS, MSR des différentes MATs, MTHFR, CBS et SAHH sur les fractions cytoplasmiques et nucléaires des HepG2, des fibroblastes contrôles (WT) et des fibroblastes de patients CblG, CblC et CblE. L' α -tubuline a été utilisée comme protéine de référence pour les fractions cytoplasmiques et la TBP comme protéine de référence des fractions nucléaires.

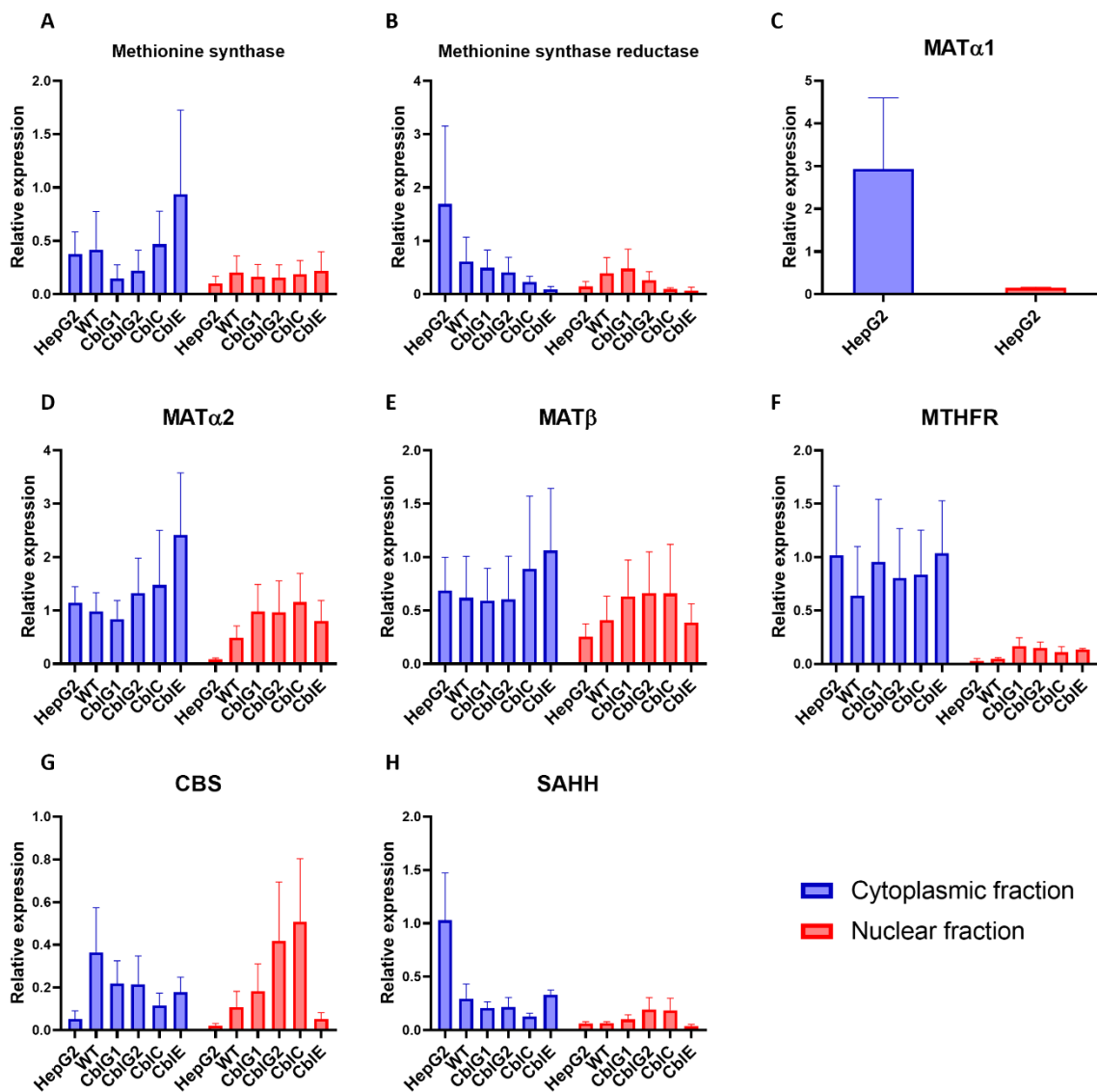


Figure 50 : Densitométrie des Western blots MS, MSR, MATs, MTHFR, CBS et SAHH sur fractions cytoplasmiques et nucléaires.

Analyse densitométrique des bandes de chaque blot de Western et analyse statistique (GraphPad Prims 8) ; moyenne \pm écart type ; N=3 ; Two-way ANOVA avec correction Tukey.

III. Confirmation d'une localisation nucléaire de la méthionine synthase, de la méthionine synthase réductase et des sous-unités MATs

Afin de poursuivre notre étude sur la localisation subcellulaire des enzymes du cycle de la méthionine, nous avons procédé à des marquages immunofluorescents des diverses protéines et nous avons observé les différents marquages par microscopie confocale avec la réalisation de d'images de très faible profondeur de champ plus communément appelé section optique ou STAC. L'utilisation de la microscopie confocale nous a permis de réaliser des images plan par plan en profondeur dans les différents échantillons et donc de déterminer si les diverses protéines se trouvaient dans le noyau et non au niveau du cytoplasme recouvrant le noyau. Tous les marquages ont été réalisés sur les cellules HepG2, les fibroblastes contrôles (WT) ainsi

que sur les fibroblastes CblG, CblC et CblE. Les expériences ont été reproduites trois fois indépendamment sur des passages différents de cellules afin de réaliser des répliques biologiques et techniques.

Dans un premier temps nous avons confirmé la présence de la MS dans le noyau de toutes les lignées en plus de sa localisation cytoplasmique connue. Comme mentionné précédemment, on peut observer une diminution du marquage dans les cellules CblG déficientes en MS comparées aux WT (*Figure 51*). De plus, nous avons confirmé les résultats de Western blot montrant une localisation de la MSR majoritairement cytoplasmique mais aussi légèrement nucléaire. Enfin, nous pouvons observer une diminution du marquage de cette protéine dans les cellules de patients déficients en MSR (CblE) (*Figure 52*).

Dans un second temps nous avons investigué la localisation subcellulaire des MATs. Les MATs sont des enzymes connues pour être cytoplasmiques mais des études ont mis en évidence leur localisation nucléaire leur permettant d'interagir avec différents acteurs génétiques comme les méthyltransférases ou encore des promoteurs (Kato et al. 2011 ; Kera et al. 2013). Nos résultats confirment la localisation nucléaire de MAT α 2 (*Figure 53*). De plus, nous avons remarqué que la localisation subcellulaire de MAT α 2 était plus prononcée au niveau nucléaire qu'au niveau cytoplasmique témoignant potentiellement d'une forte activité de l'enzyme dans le compartiment nucléaire. Il est important de noter que cette forte localisation nucléaire semble beaucoup moins importante dans les cellules de patients déficients en MS (CblG) (*Figure 53*). Concernant la sous-unité régulatrice de l'enzyme MAT II, MAT β nous pouvons là aussi observer une forte localisation nucléaire de la protéine dans les cellules HepG2, les fibroblastes contrôles et les fibroblastes CblE. Cependant, dans les cellules de patients CblG et CblC on remarque que l'intensité du marquage est similaire entre le cytoplasme et le noyau (*Figure 54*). Pour finir, nous avons étudié la localisation subcellulaire de MAT α 1 dans les cellules HepG2. Nous avons mis en évidence une localisation principalement cytoplasmique et un léger marquage nucléaire, voir périnucléaire (*Figure 55*).

Ces résultats de marquage immunofluorescent nous permettent de conclure sur la localisation nucléaire en plus de la localisation cytoplasmique, de la MS, de la MSR ainsi que des sous-unité MATs.

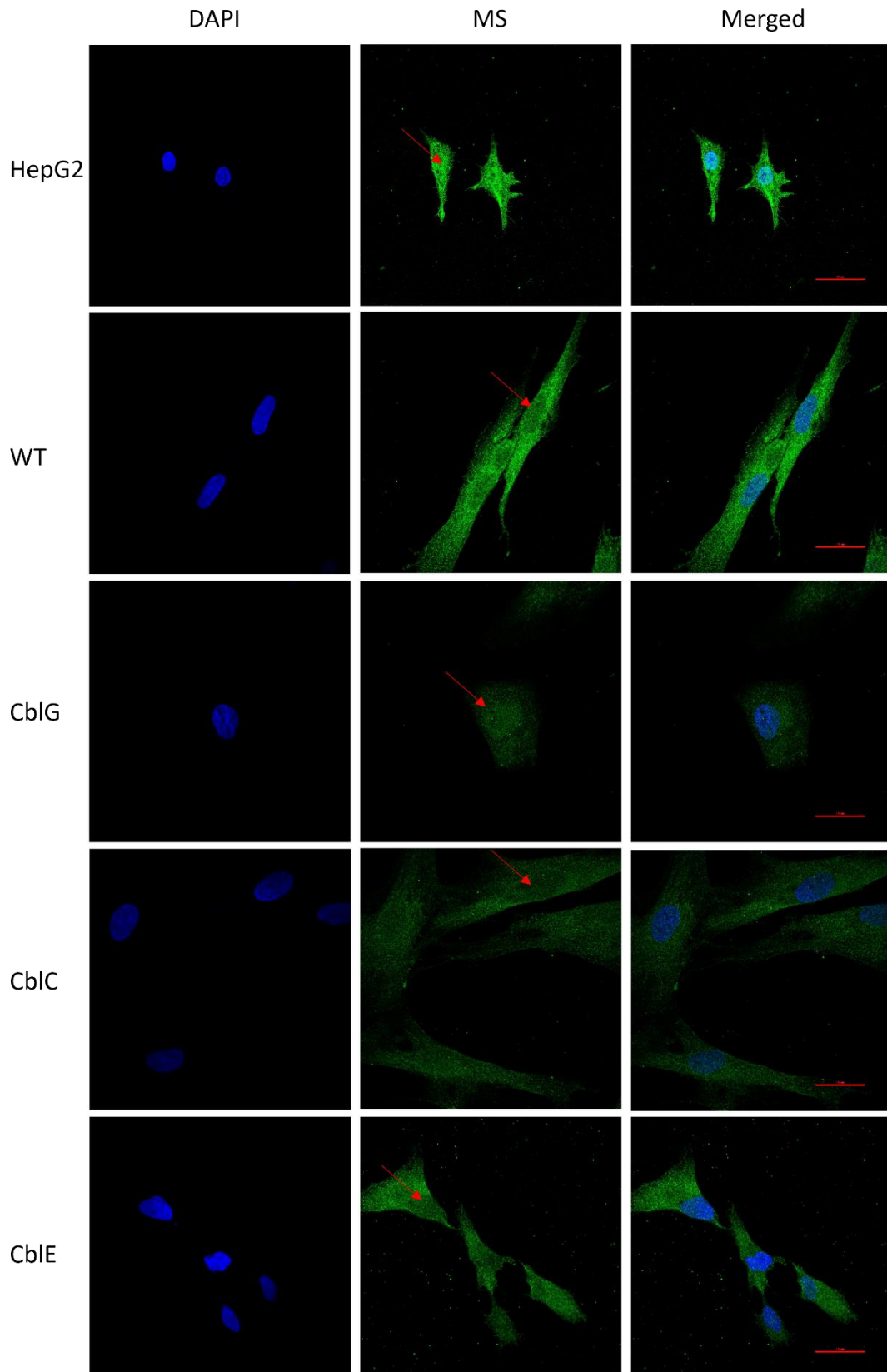


Figure 51 : Localisation subcellulaire de la MS observée par immunofluorescence.

Les cellules HepG2, les fibroblastes contrôles (WT) ainsi que les fibroblastes de patients CbIG, CbIC et CbIE ont été marqués avec un anticorps contre la MS, visualisés et imagés au microscope confocal Nikon C2 ; N=3. Les flèches rouges mettent en évidence le marquage nucléaire de la protéine.

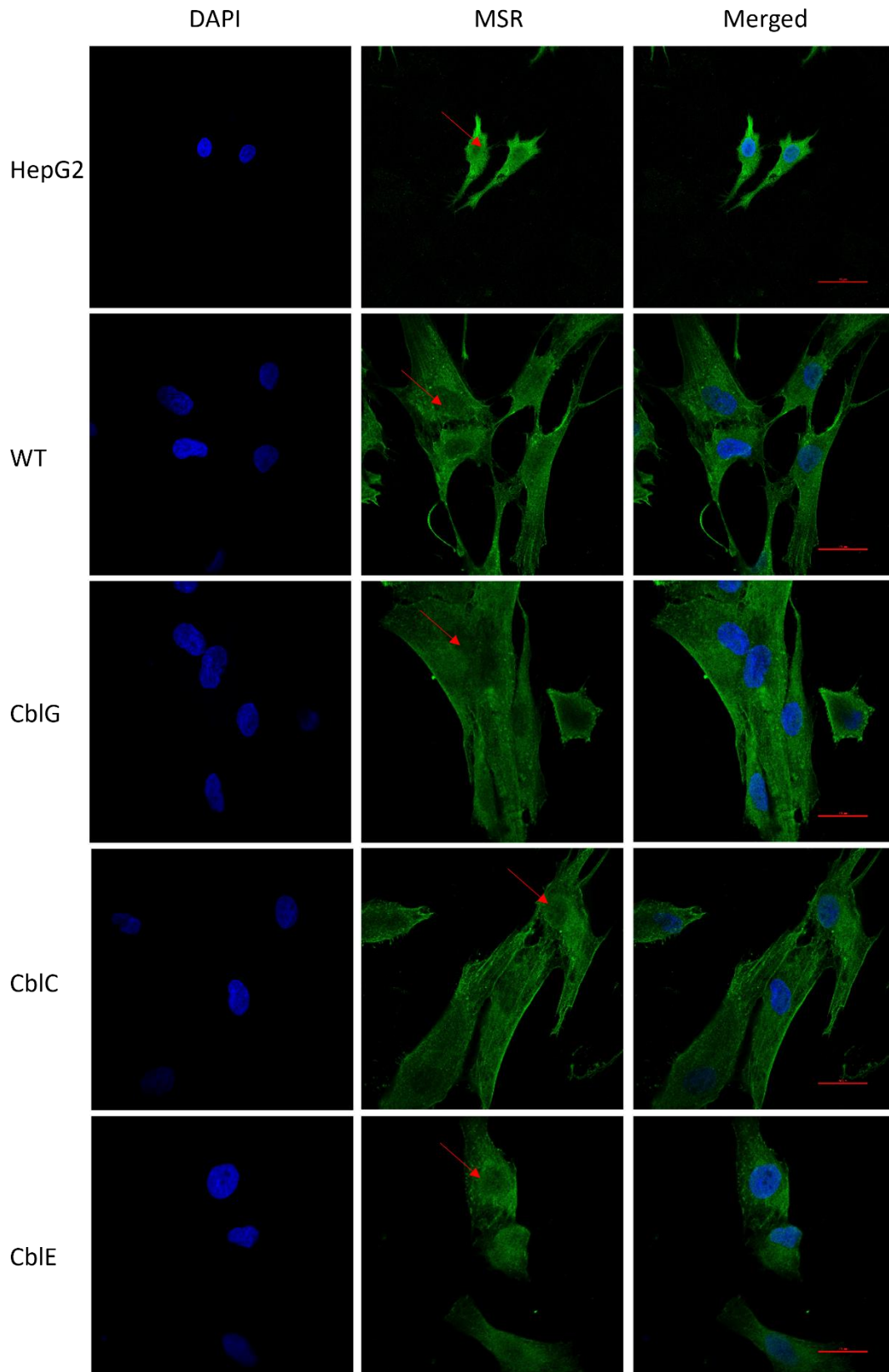


Figure 52 : Localisation subcellulaire de la MSR observée par immunofluorescence.

Les cellules HepG2, les fibroblastes contrôles (WT) ainsi que les fibroblastes de patients Cb1G, Cb1C et Cb1E ont été marqués avec un anticorps contre la MSR, visualisés et imagés au microscope confocal Nikon C2 ; N=3. Les flèches rouges mettent en évidence le marquage nucléaire de la protéine.

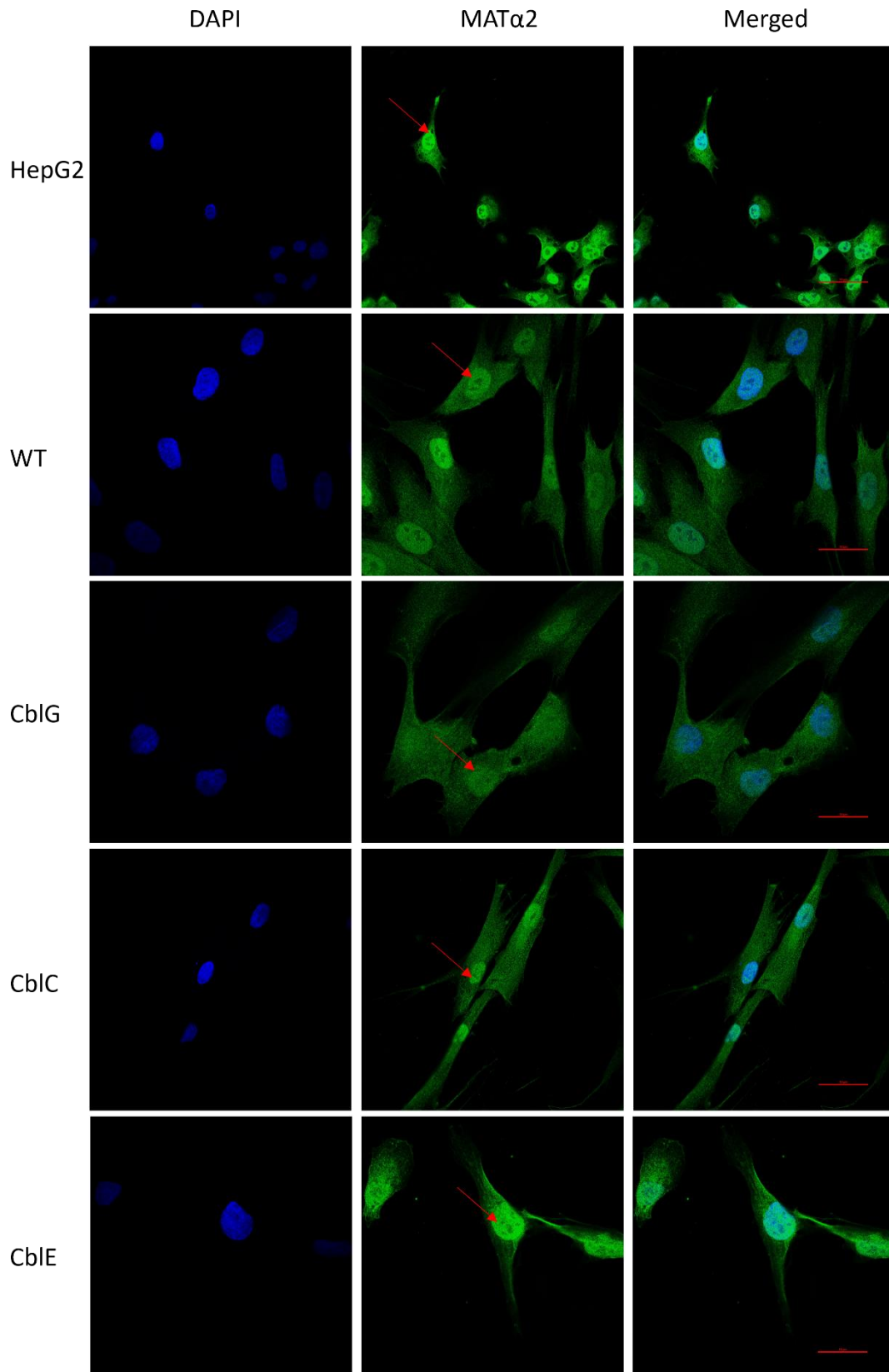


Figure 53 : Localisation subcellulaire de la sous-unité catalytique MAT α 2 observée par immunofluorescence.

Les cellules HepG2, les fibroblastes contrôles (WT) ainsi que les fibroblastes de patients CbIG, CbIC et CbIE ont été marqués avec un anticorps contre la sous-unité MAT α 2, visualisés et imagés au microscope confocal Nikon C2 ; N=3. Les flèches rouges mettent en évidence le marquage nucléaire de la protéine.

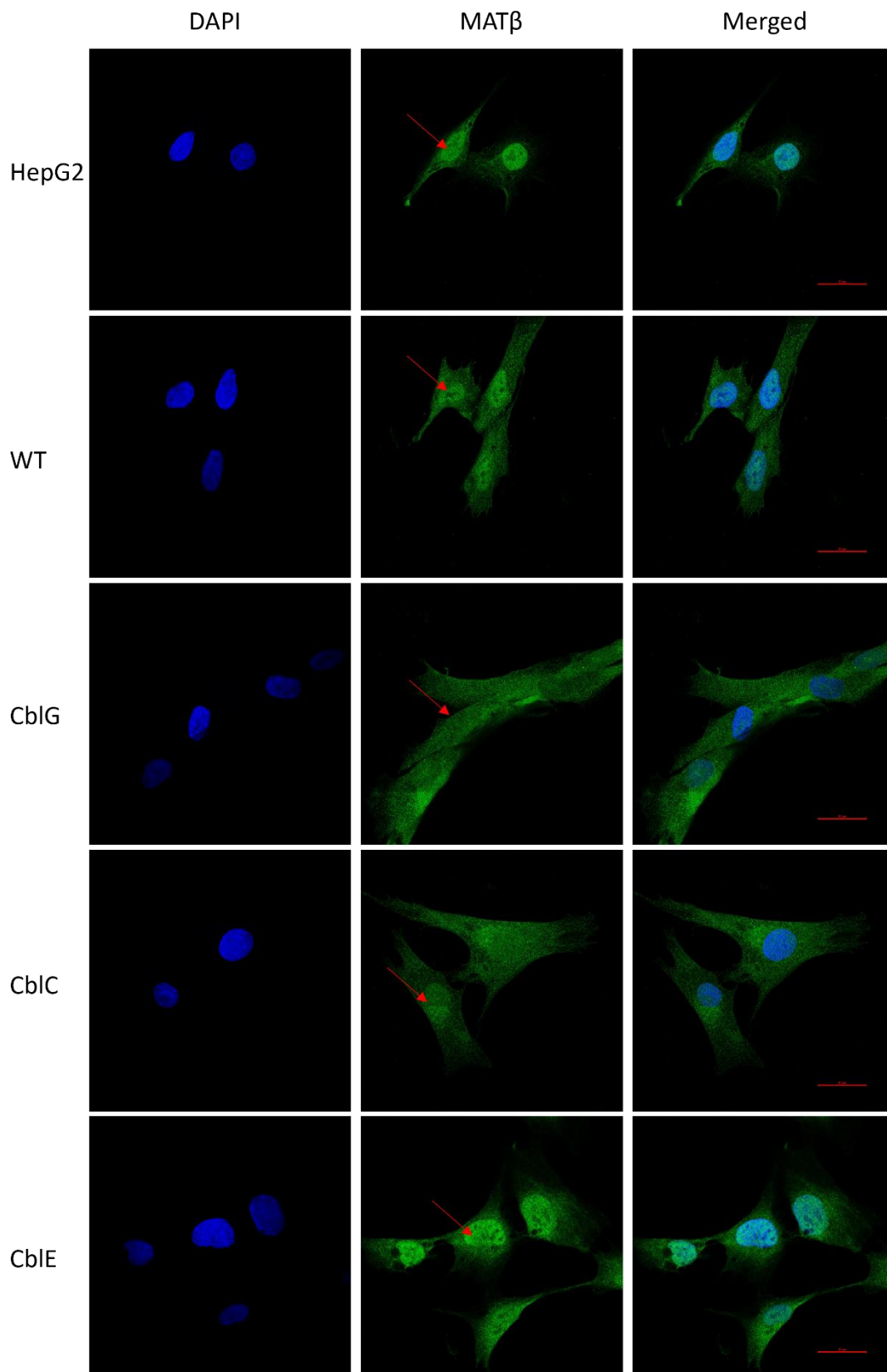


Figure 54 : Localisation subcellulaire de la sous-unité régulatrice MAT β observée par immunofluorescence.

Les cellules HepG2, les fibroblastes contrôles (WT) ainsi que les fibroblastes de patients CbIG, CbIC et CbIE ont été marqués avec un anticorps contre la sous-unité MAT β , visualisés et imagés au microscope confocal Nikon C2 ; N=3. Les flèches rouges mettent en évidence le marquage nucléaire de la protéine.

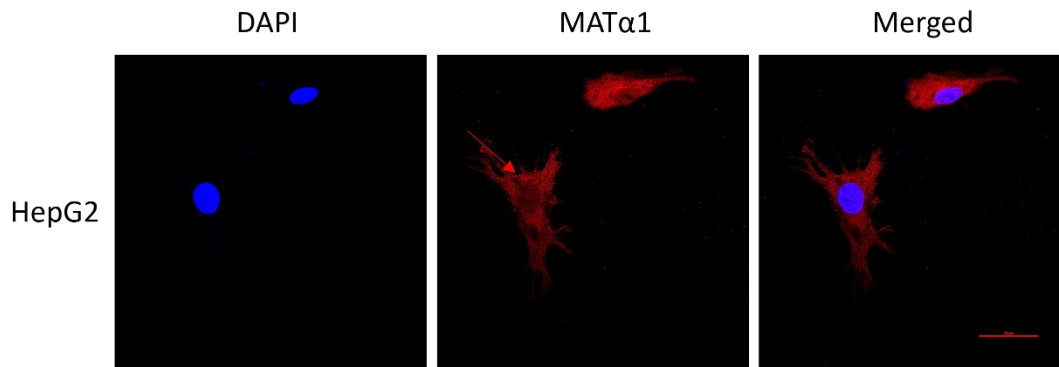


Figure 55 : Localisation subcellulaire de la sous-unité régulatrice MAT α 1 observée par immunofluorescence.

Les cellules HepG2 ont été marquées avec un anticorps contre la sous-unité MAT α 1, visualisées et imagées au microscope confocal Nikon C2 ; N=3. La flèche rouge met en évidence le marquage nucléaire de la protéine.

IV. Localisation subcellulaire d'une protéine de fusion MS-GFP

Dans le but de d'étudier la localisation nucléaire de la méthionine synthase par une autre technique nous permettant de nous affranchir de l'utilisation d'anticorps et donc du potentiel biais qu'il pourrait engendrer, nous avons mis au point un plasmide exprimant la MS, soit la protéine de 144 kDa, soit la protéine de 124 kDa, couplée à la "green fluorescent protein" (GFP). Ces deux plasmides ont ensuite été transfectés dans des cellules HEK293 qui sont des cellules très permissives à la transfection de plasmide. Dans un premier temps, nous avons réalisé un marquage immunofluorescent de la MS dans des cellules HEK239T non transfectées avec les plasmides pour mettre en évidence la localisation subcellulaire de la MS native au sein des cellules. Nous avons pu confirmer dans ce modèle cellulaire la localisation cytoplasmique mais aussi nucléaire de l'enzyme (*Figure 56*). Dans un second temps, nous avons réalisé la transfection des cellules HEK293T avec les deux plasmides MS-GFP (144 et 124 kDa). Nous avons fixé et perméabilisé nos cellules puis nous avons réalisé un marquage du noyau au DAPI avant de les visualiser par microscopie confocale. Nous avons pu là aussi confirmer que la MS était localisée dans le cytoplasme mais aussi dans le noyau des cellules HEK293T après transfection par les plasmides MS-GFP. De plus, nous avons montré que l'isoforme à 144 et l'isoforme à 124 kDa pouvaient être retrouvées au niveau nucléaire (*Figure 56*). Ces résultats nous ont permis une nouvelle fois de mettre en lumière la double localisation cytoplasmique et nucléaire de la méthionine synthase.

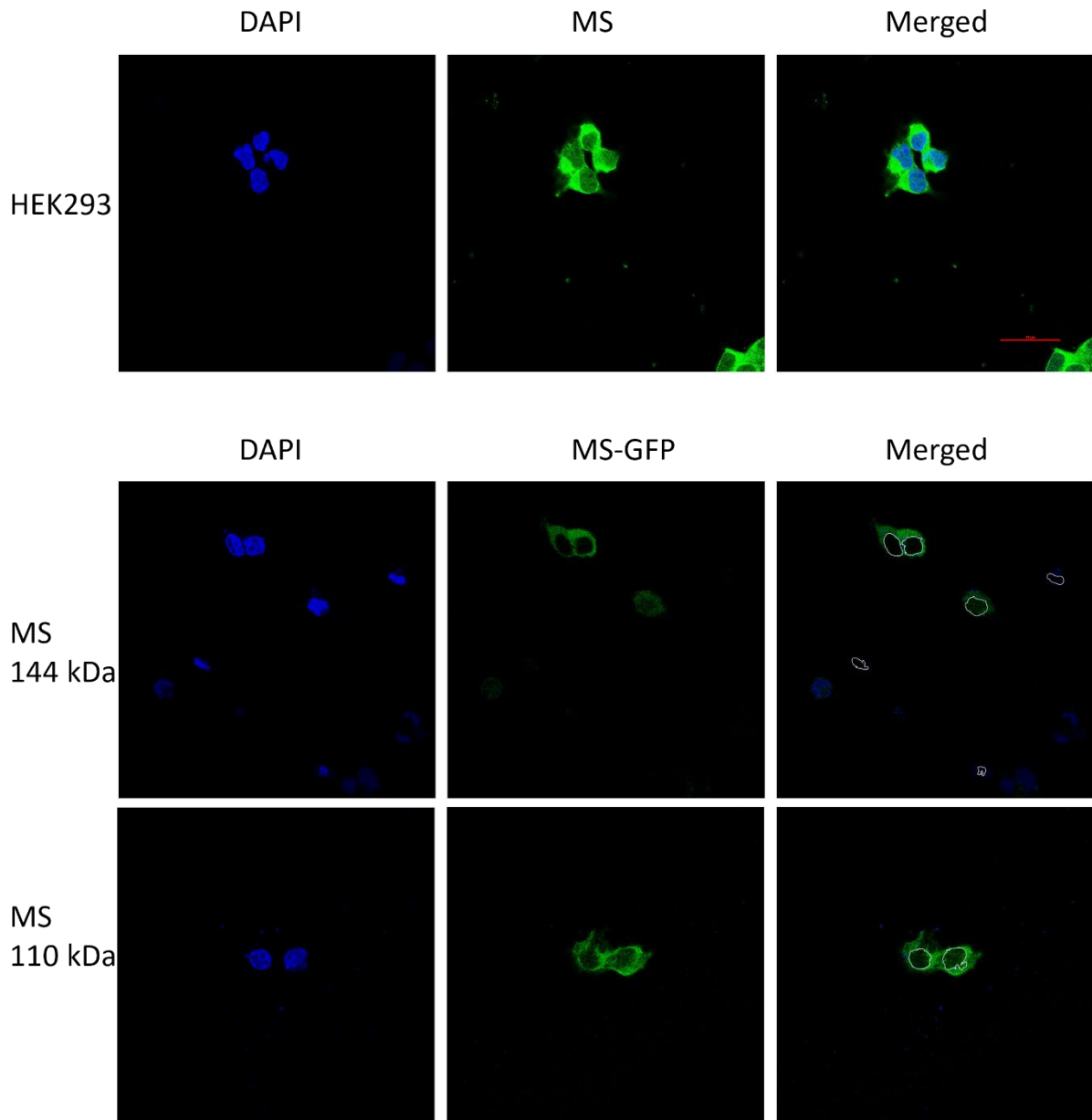


Figure 56 : Localisation subcellulaire de la méthionine synthase couplée à la GFP après transfection des plasmides MS-GFP dans des cellules HEK293.

Les cellules HEK293 ont été utilisées pour un marquage immunofluorescent contre la MS en utilisant l'anticorps précédemment utilisé pour les marquages immunofluorescents de la MS dans les autres types cellulaires afin de localiser la MS native au sein de ces cellules. Les HEK293 ont ensuite été transfectées avec un plasmide MS-GFP permettant la production de la MS de 144 kDa ou de 124 kDa couplées à la GFP (Green Florescent Protein) afin de s'affranchir de l'utilisation d'un anticorps pour visualiser la localisation subcellulaire de la protéine. Les cellules ont été visualisées par microscopie confocale, n=5, N=3.

V. Etude *in silico* des partenaires protéiques potentiels de la MS

En parallèle de toutes ces analyses expérimentales sur la localisation de la méthionine synthase, nous avons étudié diverses bases de données afin de mettre en lumière des potentielles cibles interagissant avec la MS ou la MSR dans les différents compartiments subcellulaires. Pour cela nous avons utilisé 5 bases de données compilant des interactions

protéine-protéine (BioGRID, HuRI, IntAct, STRING et BioPlex) et une base de données répertoriant des prédictions d'interactions protéine-protéine (FpClass).

A l'issue des données récoltées dans ces différentes bases de données nous avons croisé les résultats afin d'identifier les protéines communes aux différentes bases de données (*Figure 57*).

MS	BioGrid	HuRI	IntAct	String	BioPlex
Number of interactors	110	1	35	4	56
Common interactors	51/110	1/1	20/35	3/4	37/56
Total common interactors	53				

MSR	BioGrid	HuRI	IntAct	String	BioPlex
Number of interactors	16	1	35	4	-
Common interactors	5/16	1/1	1/35	4/4	-
Total common interactors	5				

MS/MSR	
Common interactors that appear only once in MS or MSR databases	40

Figure 57 : Récapitulatif du nombre d'interactions protéine-protéine prédites par les différentes bases de données pour la MS et la MSR.

Nous nous sommes par la suite plus particulièrement intéressés à la base de données FpClass qui prédit 59 interactions avec la MS dont 33 protéines exclusivement nucléaires ayant une activité méthyltransférases ou encore impliquées dans la réorganisation de la chromatine. Cette étude nous a permis de mettre en évidence quelques partenaires potentiels de la MS et de confirmer nos résultats indiquant une localisation nucléaire de la MS.

VI. Mécanismes pouvant être impliqués dans la localisation nucléaire de la méthionine synthase

Habituellement, les protéines possédant un poids moléculaire supérieur à 40 kDa requièrent un signal d'import nucléaire afin d'être transloquées dans le noyau (Cautain et al. 2015). Cependant, il a été montré dans la littérature que la translocation nucléaire de la BHMT (bétaine hydroxyméthyltransférase) se réalisait malgré l'absence de séquence consensus de translocation nucléaire (Pérez-Miguelsanz et al. 2017b). Nous avons analysé la séquence du gène *MTR* par l'exploration de bases de données comme *Compartments* ou *Embed.Protein.Properties*. De plus, nous avons utilisé des sites internet permettant de prédire la localisation subcellulaire des protéines en fonction de la séquence nucléotidique (*MULocDeep*, *mLASSO-Hum*, *Predict Protein* et *Psort II*). Ces diverses analyses nous ont permis de montrer que la séquence du gène *MTR* ne possède ni signal d'import nucléaire, ni signal d'import mitochondrial et que la MS est retrouvée dans le cytoplasme d'après les données de la littérature et les prédictions. Cependant certaines données suggèrent une localisation cytoplasmique de la protéine à 61%, nucléaire à 30,4% et dans d'autres organelles à 8,6%. De plus, la méthode Reinardt's, qui se base sur la composition en acides aminés de la protéine, utilisée par le site *Psort II* calcule un pourcentage de localisation d'une protéine. En effet le site *Psort II* utilise cette méthode selon laquelle les protéines nucléaires sont généralement

riches en résidus basiques. Si la somme des compositions en lysines et arginines est supérieure à 20%, on considère que la protéine a plus de chance d'être nucléaire que cytoplasmique (Reinhardt et Hubbard 1998). Avec cette méthode nous avons pu déterminer que la MS possédait une localisation cytoplasmique à 94,1%.

Outre la séquence d'import nucléaire, certaines protéines nécessitent des modifications post-traductionnelles afin de rejoindre le compartiment nucléaire comme la SUMOylation qui a été retrouvée sur toutes les enzymes du cycle des folates nucléaires ou encore la O-N-acétylglycosamination retrouvée là aussi sur de nombreuses protéines et associée à leur translocation nucléaire (Ma et Hart 2014). Enfin, des enzymes du cycle des folates comme MTHFD1 (méthylène tétrahydrofolate déshydrogénase) ou GNMT (glycine N-méthyltransférase) subissent une translocation nucléaire dépendante du cycle cellulaire ayant lieu lors de la phase S. Ces deux enzymes ne possèdent pas non plus de signal d'import nucléaire (Y.-C. Wang et al. 2014). D'après ces diverses données de la littérature nous nous sommes donc questionnés sur les mécanismes moléculaires qui pourraient être responsables de la translocation nucléaire de la MS.

Nous avons dans un premier temps étudié la possibilité que la MS soit modifiée post-traductionnellement par un motif O-N-acétylglucosamine (O-N-GlcNac). Pour ce faire, nous avons réalisé une immunoprécipitation de la MS et nous avons réalisé un western blot contre le motif O-N-GlcNac. Nous avons confirmé l'immunoprécipitation de la MS dans tous les extraits ainsi que sa localisation subcellulaire grâce au western blot contre la MS suivant l'immunoprécipitation de cette dernière avec un autre anticorps. Ensuite nous avons réalisé un Western blot contre le motif O-N-GlcNac et nous avons déterminé si ce motif interagissait avec l'enzyme. Nous avons retrouvé ce motif dans les Input mais pas dans les échantillons immunoprécipités (IP) ce qui signifie que le motif O-N-GlcNac et la MS n'est pas O-N-acétylglucosaminée (*Figure 58*). Ces résultats suggèrent donc que la localisation nucléaire de la MS est régulée par un autre processus.

Ensuite nous nous sommes penchés sur la SUMOylation, une autre modification post-traductionnelle pouvant expliquer sa localisation nucléaire. Nous avons donc réalisé une immunoprécipitation de la MS suivi d'un western blot contre le motif SUMO-1. Les petits modificateurs SUMO 1, 2 et 3 sont des membres de la famille des protéines de type ubiquitine. La SUMOylation est un processus réversible en plusieurs étapes. La modification SUMO-1 a déjà été décrite dans la littérature comme impliquée dans la régulation du trafic nucléaire, la formation de structure sous-nucléaires, la régulation de l'activité transcriptionnelle et la stabilité des protéines. Nous avons tout d'abord confirmé l'immunoprécipitation de la MS en réalisant un western blot contre cette dernière avec un autre anticorps. Nous avons ensuite réalisé un western blot contre le motif SUMO-1. Nous pouvons observer que le marquage est retrouvé dans tous les Input mais aussi dans les puits IP pouvant témoigner d'une SUMOylation de la MS. Cependant, lorsqu'une protéine est SUMOylée, son poids moléculaire peut gagner plusieurs dizaines de kDa suivant le nombre de groupements SUMO déposés sur

la protéine, or ici nous n'avons pas observé de modification de la taille de la MS à 144 kDa et à 110 kDa (*Figure 59*).

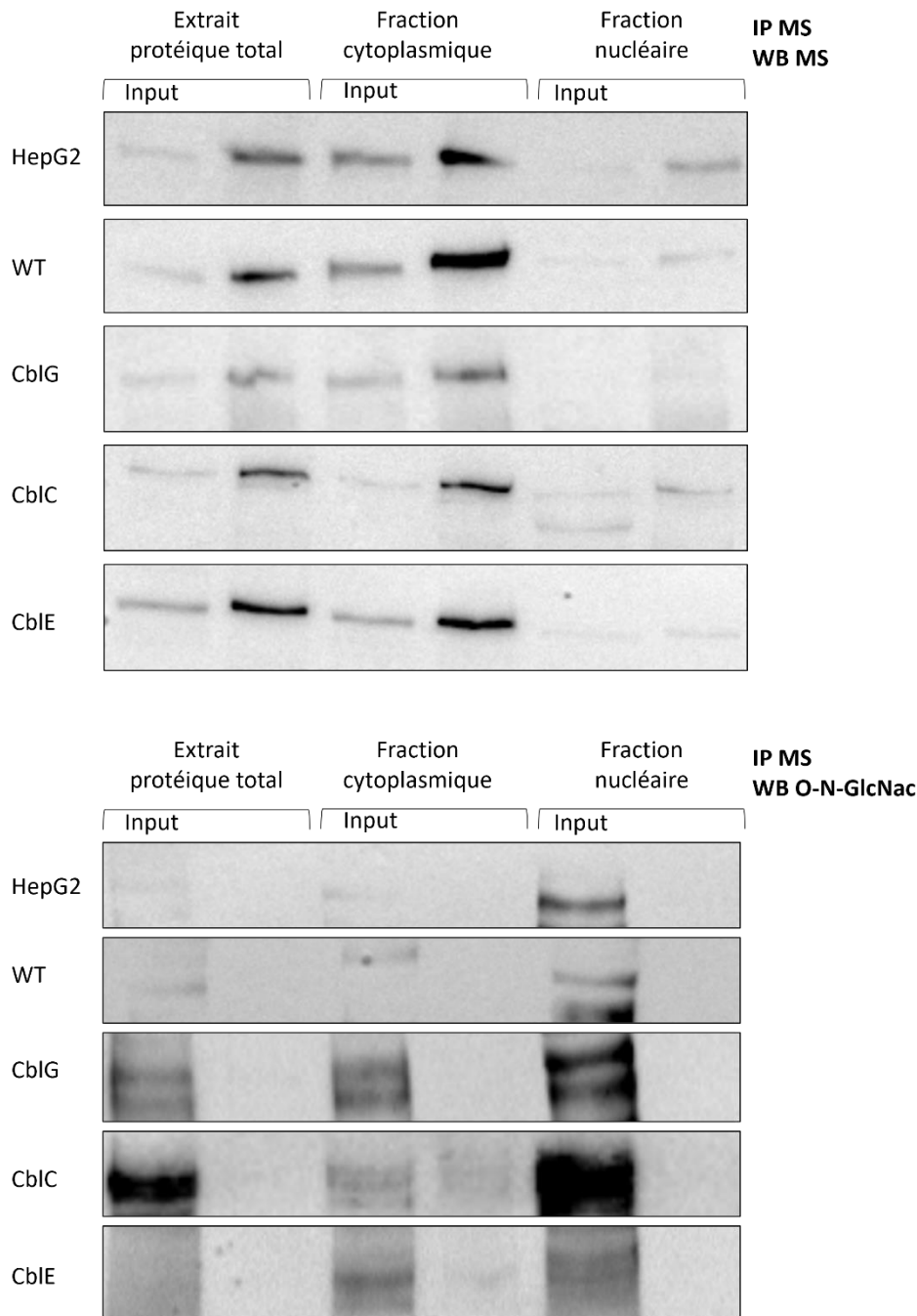


Figure 58 : Etude de l'O-N-acétylglucosamination de la méthionine synthase par immunoprécipitation de la MS et Western blot.

Les cellules HepG2, les fibroblastes contrôles ainsi que les fibroblastes de patients (CbIG, CbIC et CbIE) ont subi un fractionnement subcellulaire puis les fractions cytoplasmiques et nucléaires ainsi que les extraits protéiques totaux ont été utilisés pour une co-immunoprécipitation de la MS suivi d'un western blot contre la MS avec un autre anticorps pour confirmer l'immunoprécipitation et contre le motif O-N-acétylglucosamine (O-N-GlcNAc). Input : protéines totales de l'extrait, IP : protéines immunoprécipitées. N=3.

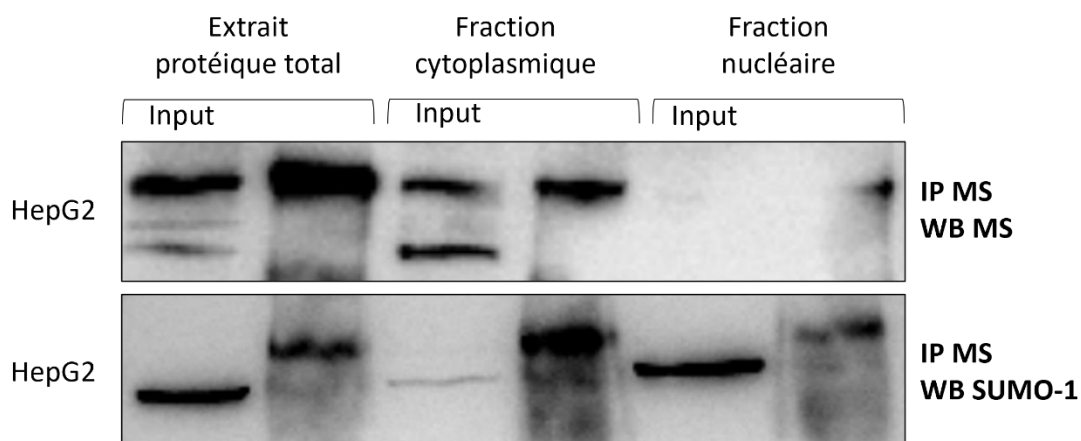


Figure 59 : Etude de la SUMOylation via SUMO-1 de la méthionine synthase par immunoprécipitation et Western blot.

Les cellules HepG2 ont subi un fractionnement subcellulaire puis les fractions cytoplasmiques et nucléaire ainsi que les extraits protéique totaux ont été utilisés pour une co-immunoprécipitation de la MS suivie d'un western blot contre la MS avec un autre anticorps pour confirmer l'immunoprécipitation et contre le motif SUMO-1. Input : protéines totales de l'extrait, IP : immunoprécipitation. N=3.

Pour finir, nous avons étudié l'influence du cycle cellulaire sur la localisation subcellulaire de la MS. Nous avons utilisé le kit de prolifération Click-iT EdU Alexa Fluor afin de marquer les cellules en phase exponentielle de prolifération. En effet, l'EdU (5-éthynyl-2'-désoxyuridine) est un analogue nucléosidique de la thymidine qui est incorporé dans l'ADN au cours de la synthèse d'ADN actif. En parallèle nous avons réalisé un marquage par immunofluorescence de la MS et nous avons observé la localisation de cette dernière en fonction de l'état prolifératif des cellules. Nous avons pu mettre en évidence que le marquage de la MS était identique à celui observé précédemment et qu'il n'y avait pas de corrélation entre le marquage EdU et la MS (*Figure 60*). La prolifération ou les phases du cycle cellulaire ne semblent donc pas influencer la localisation subcellulaire de la méthionine synthase.

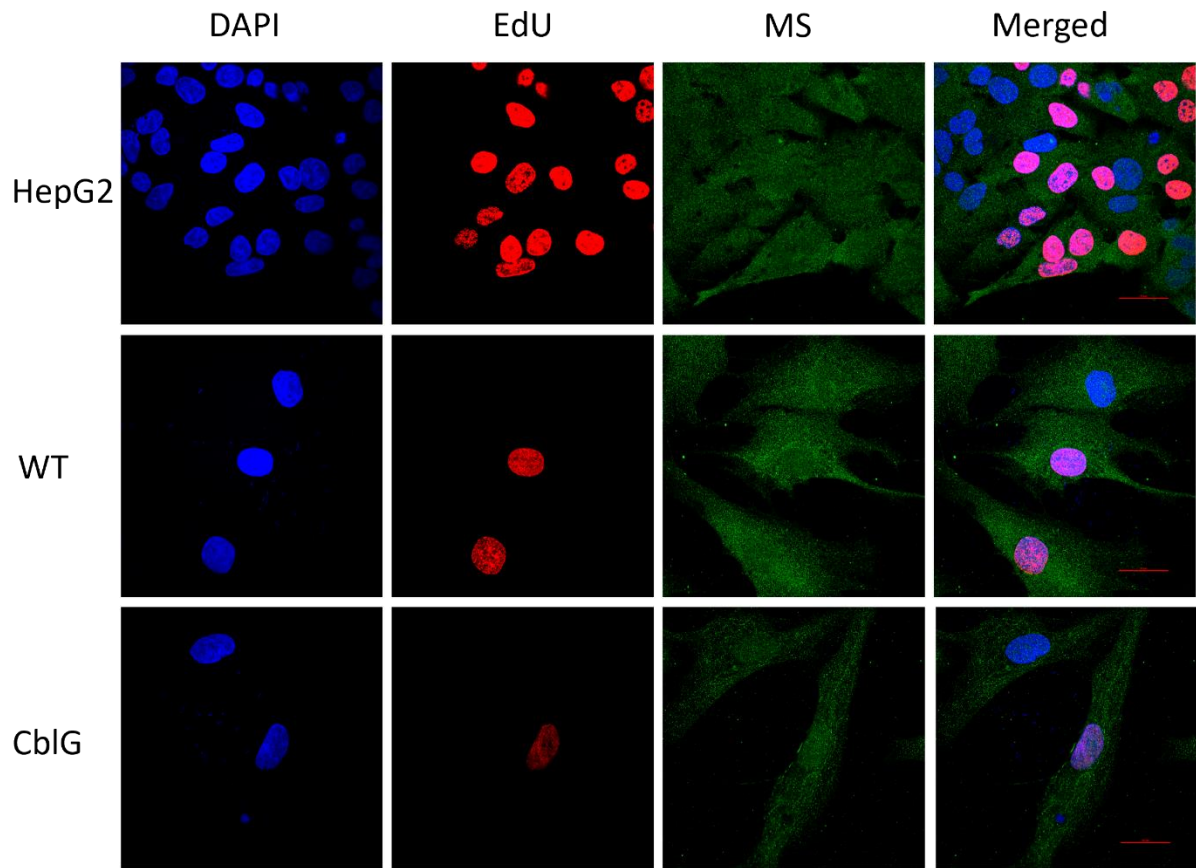


Figure 60 : Localisation subcellulaire de la méthionine synthase et marquage des cellules en prolifération par l'EdU visualisées par microscopie confocale.

Les cellules HepG2, les fibroblastes contrôles (WT) ainsi que les fibroblastes CbIG ont été marqués à l'EdU et avec un anticorps dirigé contre la MS afin de déterminer si la localisation subcellulaire de la MS était influencée par le cycle cellulaire. Les cellules ont été visualisées par microscopie confocale. EdU : 5-éthynyl-2'-désoxyuridine. N=2.

Partie 2 : Activité enzymatique nucléaire de la méthionine synthase

Avant d'évaluer l'activité enzymatique de la méthionine synthase dans les différents compartiments subcellulaires à savoir le cytoplasme et le noyau, nous avons commencé par mesurer les métabolites intermédiaires du métabolisme des monocarbone dans les différentes fractions. Dans un premier temps nous nous sommes intéressés à la mesure de tous les métabolites du cycle de la méthionine dans la fraction cytoplasmique et dans la fraction nucléaire des cellules HepG2, des fibroblastes contrôles et de patients CblG déficients en MS. Par la suite, afin d'analyser l'activité enzymatique de la MS, nous avons réalisé une expérience d'incorporation *in vitro* de 5-méthyltétrahydrofolate (5-meTHF) marqué au ^{14}C et nous avons quantifié la méthionine marquée au ^{14}C nouvellement formée. Pour confirmer le résultat obtenu via l'incorporation de 5- ^{14}C meTHF nous avons réalisé une étude d'incorporation d'homocystéine marquée au deutérium (^2H ou D) sur le squelette carboné et nous avons réalisé une mesure de la méthionine-D4, de la SAM-D4 et de la SAH-D4 par chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse en tandem (LCMS/MS).

I. Tous les métabolites du cycle de la méthionine sont présents dans le noyau

La présence de la MS nucléaire suggère fortement l'existence d'un cycle de la méthionine nucléaire fonctionnel. Les enzymes du cycle de la méthionine étant présentes dans le cytoplasme mais aussi dans le noyau des cellules HepG2, des fibroblastes contrôles et des différents fibroblastes de patients, nous avons investigué la présence des différents intermédiaires du cycle de la méthionine, de quelques métabolites du cycle des folates ainsi que des métabolites de la voie de transsulfuration.

A. Les métabolites du cycle de la méthionine

Dans un premier temps, nous avons analysé les métabolites intermédiaires du cycle de la méthionine. Nous avons mis en évidence la présence de méthionine dans le cytoplasme mais aussi dans le noyau des cellules HepG2, des fibroblastes contrôle et des fibroblastes de patients CblG. Les valeurs obtenues sont du même ordre de grandeur que ce soit dans le cytoplasme ou dans le noyau. Les patients CblG sont caractérisés par une diminution de la production de méthionine due à l'activité plus faible de la méthionine synthase. Or, ici on ne détecte pas de différence entre les fibroblastes contrôles et les CblG. Cela pourrait s'expliquer par le fait que les cellules ont été cultivées dans un milieu contenant de la méthionine et comme mentionné en introduction, la méthionine cellulaire peut provenir du cycle de la méthionine, de l'alimentation ou du catabolisme des protéines. Ce résultat est concordant avec les données obtenues en immunofluorescence et en western blot sur les fractions nucléaires des cellules CblG. Cependant, l'absence de description d'un transporteur nucléaire de méthionine suggère que la détection de méthionine nucléaire est le résultat d'une production *de novo* ou d'une diffusion passive à travers le pore nucléaire encore non-décrite.

Le métabolite suivant du cycle de la méthionine est la S-adénylméthionine (SAM) qui a aussi été détectée dans le noyau des différentes lignées. Là aussi on n'observe pas de différence significative entre les fibroblastes contrôles et les cellules CblG que ce soit dans le cytoplasme ou dans le noyau. La méthionine nécessaire à la synthèse de SAM pouvant provenir de la production *de novo* par le cycle de la méthionine ou par le catabolisme des protéines ou l'alimentation, nous supposons que l'absence de différence significative dans la mesure de la SAM entre les contrôles et les cellules CblG est dû à la synthèse de SAM réalisée via la méthionine exogène principalement. Concernant la SAH, nous avons pu détecter ce métabolite dans le cytoplasme et le noyau de toutes les lignées avec une diminution significative ($p < 0,001$) de sa concentration dans les fibroblastes CblG comparé aux contrôles dans le cytoplasme. Cependant cette différence n'est pas du tout observée dans les fractions nucléaires. De plus, les niveaux de SAH sont approximativement quatre fois plus bas dans le noyau que dans le cytoplasme. La SAH pouvant être produite par hydrolyse de la SAM ou par conversion de l'homocystéine, ce paramètre peut donc fortement varier en fonction du taux d'homocystéine cellulaire.

L'homocystéine a aussi été détectée dans tous les compartiments des 3 lignées cellulaires. Nous n'avons pas mis en évidence de différence significative entre les contrôles et les CblG dans les deux compartiments mais tout de même une tendance à l'augmentation de la concentration en homocystéine dans les cellules CblG ($p = 0,0597$) comparée aux fibroblastes contrôles. Cela concorde avec les résultats de la littérature qui montrent une hyperhomocystéinémie chez les patients déficients en MS. Nous avons aussi détecté des métabolites du cycle de reméthylation de l'homocystéine par la bétaine hydroxyméthyltransferase (BHMT) uniquement présente dans le foie (choline, diméthylglycine (DMG), bétaine). Nous avons détecté la choline, la bétaine et la diméthylglycine dans tous les compartiments subcellulaires de toutes les lignées. La choline et la bétaine étant naturellement présentes dans le milieu de culture, ces métabolites sont donc détectés dans les fibroblastes. Comme pour la méthionine, aucun transporteur ou signal d'import nucléaire pour la BHMT ou pour ses métabolites associés n'a été décrit dans la littérature. Pour finir, nous avons calculé l'index de méthylation via le rapport SAM/SAH et nous avons montré une augmentation significative de cet index dans les cellules CblG comparé aux contrôles ($p < 0,01$) (*Figure 61*). Cependant, nous n'avons pas détecté de différence significative dans le ratio SAM/SAH entre les fractions nucléaires.

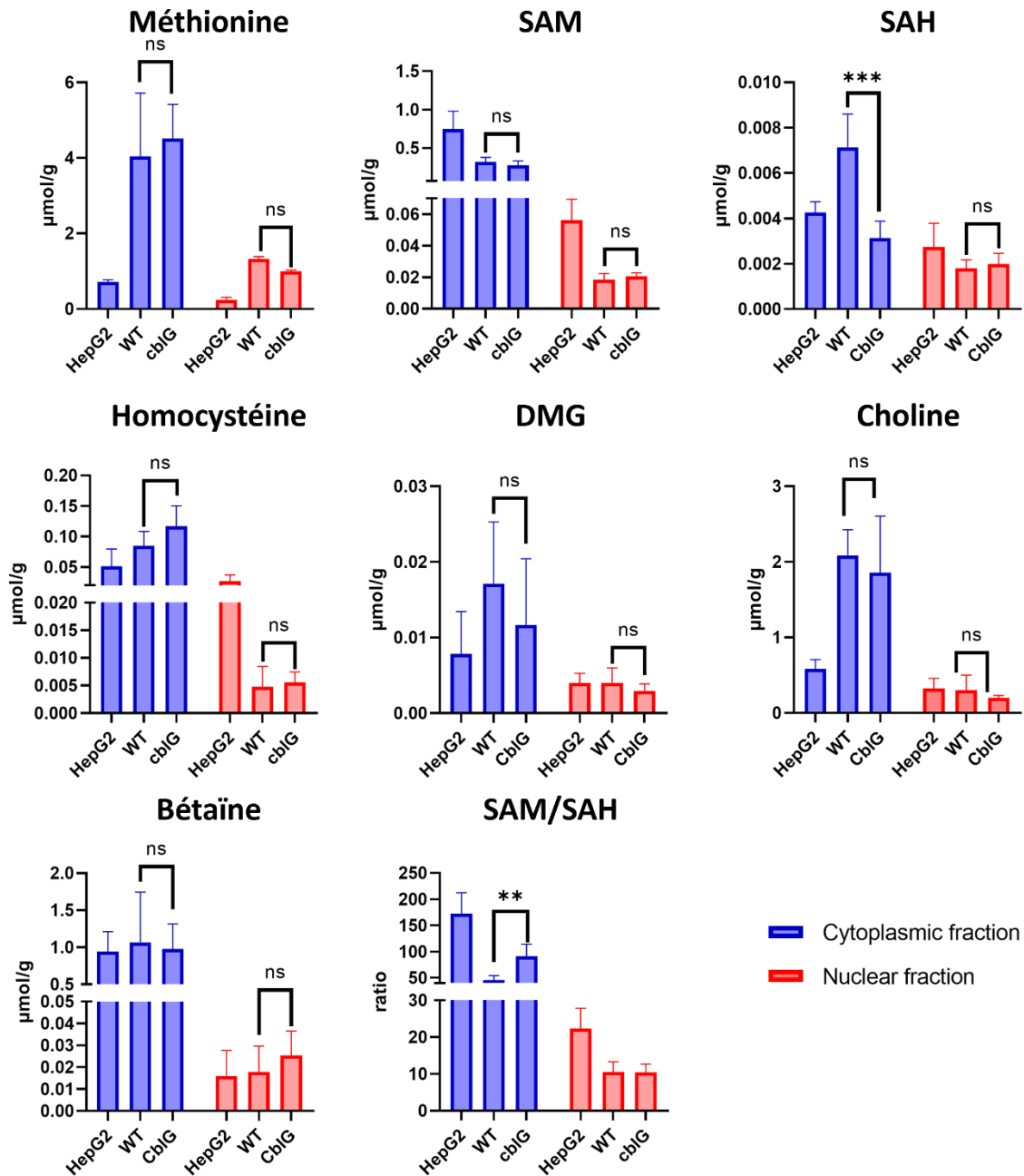


Figure 61 : Mesure des métabolites du cycle de la méthionine dans les fractions cytoplasmiques et nucléaires des cellules HepG2, des fibroblastes contrôles et CblG.

Les différentes lignées cellulaires ont subi un fractionnement subcellulaire afin de séparer les fractions cytoplasmiques et nucléaires comme décrit précédemment. Les métabolites intermédiaires du cycle de la méthionine ont été mesurés par LCMS/MS dans chaque fraction de chaque lignée. Toutes les fractions ont été déposées en triplicats biologiques pour l'analyse. Les résultats sont représentés via la moyenne des mesures pour chaque métabolite en μmol de métabolites par quantité de protéine dans les échantillons en g \pm les écart-types, $n=3$, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; Two-way ANOVA avec correction de Turkey. SAM : S- adénosylméthionine ; SAH : S- adénosylhomocystéine ; DMG : diméthylglycine.

B. Les métabolites du cycle des folates

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à la mesure des métabolites intermédiaires du cycle des folates. Nous avons détecté dans les fractions nucléaires de toutes les lignées, l'acide folique, la glycine et la sérine. La présence de ces différents métabolites témoigne d'une potentielle activité enzymatique des enzymes du cycle des folates au niveau nucléaire, ce qui a été décrit dans la littérature (*Figure 62*). MTHFR est l'enzyme responsable de la synthèse du 5-méthyltétrahydrofolate (5meTHF) que nous avons mesuré dans les fractions nucléaires de toutes les lignées cellulaires. Nous avons détecté le 5meTHF dans le noyau de toutes les lignées cellulaires à une concentration approximativement 50 fois plus basse que dans le cytoplasme, sans différence significative entre les cellules CblG et les WT.

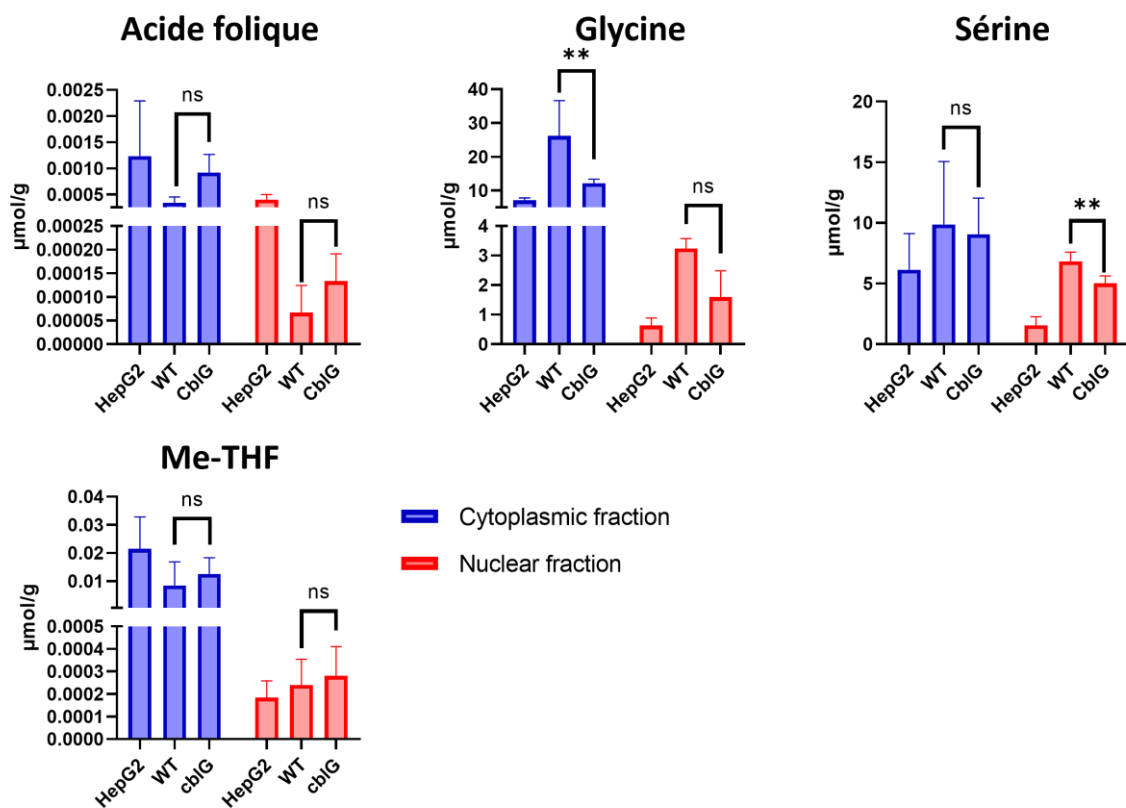


Figure 62 : Mesure des métabolites du cycle des folates dans les fractions cytoplasmiques et nucléaires des cellules HepG2, des fibroblastes contrôles et CblG.

*Les différentes lignées cellulaires ont subi un fractionnement subcellulaire afin de séparer les fractions cytoplasmiques et nucléaires comme décrit précédemment. Les métabolites intermédiaires du cycle de la méthionine ont été mesurés par LCMS/MS dans chaque fraction de chaque lignée. Toutes les fractions ont été déposées en triplicats biologiques pour l'analyse. Les résultats sont représentés via la moyenne des mesures pour chaque métabolite en µmol de métabolites par quantité de protéine dans les échantillons en g ± les écart-types, n=3, * p < 0,05 ; ** p < 0,01 ; *** p < 0,001 ; Two-way ANOVA avec correction de Turkey. Me-THF : méthyltétrahydrofolate.*

C. Les métabolites de la voie de transsulfuration

Pour finir, la dernière voie d'élimination de l'homocystéine est la voie de transsulfuration. Il a été montré récemment dans la littérature que la cystathionine-β-synthase (CBS) était présente au niveau nucléaire (Shen et al. 2020b). Nous avons donc mesuré les différents

métabolites de la voie de transsulfuration et nous avons mis en évidence la cystathionine (CTH), le glutathion et le glutamate. De plus, nous avons mesuré une diminution significative ($p < 0,001$) de la CTH dans le cytoplasme des cellules CblG comparées aux contrôles mais cette diminution n'est pas significative dans la fraction nucléaire. Concernant le glutathion, nous avons observé une augmentation significative de sa concentration dans le cytoplasme et dans le noyau ($p < 0,05$) des cellules CblG comparée aux contrôles. Enfin, nous avons montré une diminution significative ($p < 0,05$) du glutamate dans le cytoplasme des cellules CblG comparées aux contrôles et aucune différence significative dans les fractions nucléaires (*Figure 63*).

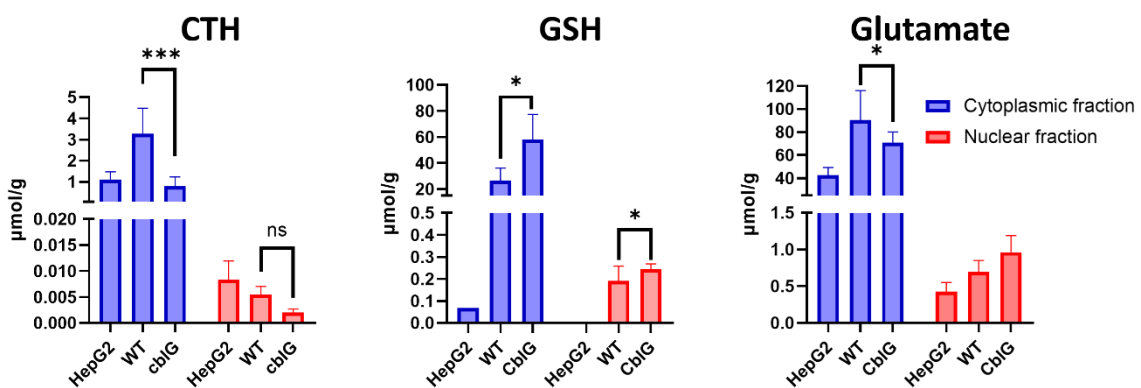


Figure 63 : Mesure des métabolites de la voie de transsulfuration dans les fractions cytoplasmiques et nucléaires des cellules HepG2, des fibroblastes contrôles et CblG.

*Les différentes lignées cellulaires ont subi un fractionnement subcellulaire afin de séparer les fractions cytoplasmiques et nucléaires comme décrit précédemment. Les métabolites intermédiaires du cycle de la méthionine ont été mesurés par LCMS/MS dans chaque fraction de chaque lignée. Toutes les fractions ont été déposées en triplicats biologiques pour l'analyse. Les résultats sont représentés via la moyenne des mesures pour chaque métabolite en μmol de métabolites par quantité de protéine dans les échantillons en $g \pm$ les écart-types, $n=3$, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; Two-way ANOVA avec correction de Turkey. CTH : cystathionine ; GSH : glutathion.*

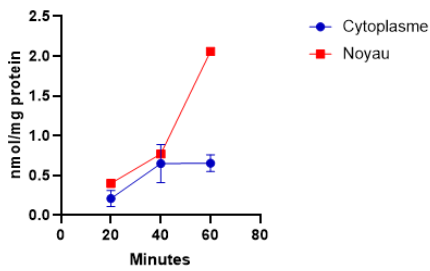
Pris dans leur ensemble, ces mesures des différents métabolites du cycle de la méthionine, du cycle des folates et de la voie de transsulfuration, sont cohérentes avec les niveaux d'expression des enzymes. Ces données soutiennent donc la localisation nucléaire des différentes enzymes et montrent une potentielle activité enzymatique de ces dernières.

II. La méthionine synthase est active dans le noyau

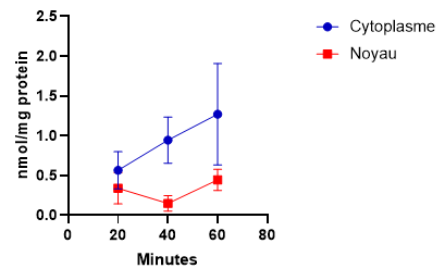
Afin d'étudier l'activité enzymatique de la méthionine synthase dans le compartiment cytoplasmique et dans le compartiment nucléaire nous avons réalisé deux types d'expérience de marquage isotopique de métabolites utilisés par la MS.

Le premier marquage a été réalisé avec le 5-méthyltétrahydrofolate (5me-THF) modifié en utilisant un isotope radioactif ^{14}C au niveau du carbone du groupement méthyle. Après fractionnement subcellulaire des cellules HepG2 et des fibroblastes contrôles, nous avons réalisé un mélange réactionnel contenant des agents réducteurs (DTT et ascorbate), des métabolites intermédiaires nécessaires à la réaction enzymatique catalysée par la MS (SAM, homocystéine, 5- ^{14}C me-THF) ainsi que le cofacteur de la MS, la vitamine B12. Toute l'expérience a été réalisée sous flux d'azote afin de travailler dans un milieu réducteur pour minimiser les effets d'oxydo-réduction des différents produits et réactifs. Une cinétique de réaction a été réalisée et des échantillons ont été prélevés à 20, 40 et 60 minutes d'incubation à 37°C afin de mimer la cinétique de réaction enzymatique (*Figure 64A et B*). A la fin de chaque temps d'incubation, les échantillons ont été chauffés à 95°C pendant 5 minutes puis redéposés sur glace. Après centrifugation, le surnageant contenant les protéines et les métabolites a été déposé sur colonne échangeuse d'anions afin de séparer la méthionine des autres composés. Après élution, le liquide contenant la méthionine radiomarquée au ^{14}C a été analysé via un compteur de rayonnement β . Grâce à cette technique, nous avons détecté de la méthionine radiomarquée dans le compartiment nucléaire, témoignant donc d'une activité enzymatique nucléaire de la MS (*Figure 64C*). Ensuite, nous avons analysé la cinétique de la réaction enzymatique et nous avons mis en évidence une augmentation de la production de méthionine radiomarquée au ^{14}C au cours du temps, que ce soit dans le compartiment cytoplasmique ou nucléaire des cellules HepG2 ou des fibroblastes de patients (*Figure 64A et B*). Ces données confortent les données antérieures du laboratoire qui avait étudié l'activité enzymatique de la MS dans des extraits de protéines totales de fibroblastes contrôle et de patients. Par la suite, nous avons mesuré la production de méthionine marquée au ^{14}C pendant 1 heure, rapportée à la quantité de protéine déposée dans chaque échantillon cytoplasmique et nucléaire (*Figure 64C*). Finalement, la production comparable de ^{14}C - méthionine dans le cytoplasme et dans le noyau après 1h d'incubation avec le 5- ^{14}C -meTHF indique que l'activité de la MS est du même ordre de grandeur dans les fractions nucléaires que dans les fractions cytoplasmiques. Cette activité nucléaire permet donc la production de méthionine directement dans le noyau.

Cinétique de l'activité enzymatique de la MS dans les HepG2



Cinétique de l'activité enzymatique de la MS dans les WT



Activité enzymatique de la MS

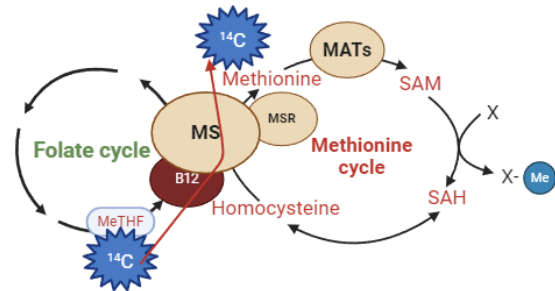
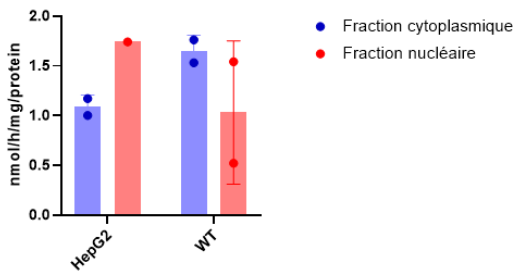


Figure 64 : Mesure de l'activité enzymatique de la méthionine synthase et cinétique de la réaction après marquage au ^{14}C dans les fractions cytoplasmiques et nucléaires des cellules HepG2 et des fibroblastes contrôles (WT).

Les fractions cytoplasmiques et nucléaires des cellules HepG2 et des fibroblastes contrôles ont été incubées avec les réactifs présents dans le cycle des monocarbone afin de pouvoir mesurer *in vitro* l'activité enzymatique de la MS. Le 5-meTHF a été radiomarqué sur le carbone de son groupement méthyle au ^{14}C et la méthionine marquée produite par la MS à partir de 5-meTHF a été mesurée à 20, 40 et 60 minutes d'incubation à 37°C . Les résultats sont représentés sous la forme de moyenne des mesures à chaque temps pour chaque condition \pm écart-type, $N=2$.

Afin de confirmer nos résultats, nous avons réalisé une seconde expérience de marquage isotopique en marquant cette fois l'homocystéine via 4 isotopes deutérés sur le squelette carboné. Nous avons ensuite réalisé la mesure de la méthionine deutérée par une analyse au LCMS/MS. La réaction entre la production d'homocystéine et de SAH étant réversible nous avons aussi pu mesurer la SAH deutérée (Figure 65).

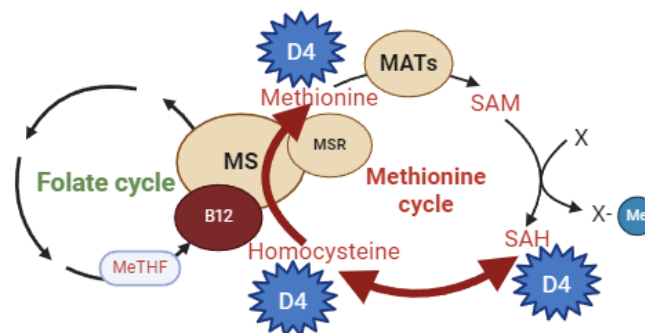


Figure 65 : Schéma d'explication du protocole d'incorporation d'homocystéine deutérée.

La mise au point de ce marquage deutéré suivi de l'analyse LCMS/MS a nécessité de nombreux ajustements que nous allons détailler dans cette partie. Afin de tester l'incorporation d'homocystéine deutérée (Hcy-D4) nous avons réalisé un test d'incorporation *in vivo* sur cellules HepG2. Les cellules ont été cultivées soit dans un milieu standard DMEM high glucose, soit dans un milieu DMEM high glucose sans méthionine, cystéine et glutamine supplémenté avec de la méthionine, de la cystéine, de la glutamine et de l'Hcy-D4 (milieu MHB), soit dans le même milieu que cité précédemment mais ne contenant pas de méthionine (milieu HB) pendant 72 heures. Les cellules ont ensuite été récoltées et les protéines totales extraites et dosées afin de réaliser une mesure de l'Hcy-D4, de la méthionine deutérée (Met-D4), de la SAM-D4 et de la SAH-D4. Nous avons validé l'incorporation *in vivo* d'Hcy-D4 comme le montre le graphique de la [Figure 66](#) où l'on observe une forte détection d'Hcy-D4 dans les cellules cultivées dans un milieu contenant de l'Hcy-D4 (HepG2 HB et MHB) comparé au milieu sans homocystéine marquée (HepG2). Cela nous a permis de valider l'incorporation et d'ajuster les paramètres d'analyse LCMS/MS afin de détecter les métabolites deutérés. Nous avons poursuivi l'analyse en mesurant la Met-D4 où l'on remarque que l'on mesure un plus fort taux de méthionine nouvellement produite dans les cellules cultivées sans apport de méthionine exogène en présence d'Hcy-D4 ce qui est conforme à ce qui est décrit dans la littérature où la méthionine synthétisée *de novo* représente environ 3% de toute la méthionine cellulaire. De manière similaire, on remarque un plus fort taux de SAM-D4 et de SAH-D4 lorsque les cellules sont cultivées en milieu sans méthionine exogène, ce qui témoigne donc que l'incorporation d'Hcy-D4 *in vivo* est capable d'activer le cycle de la méthionine afin de produire de la SAM-D4 à partir de Met-D4 ([Figure 66](#)).

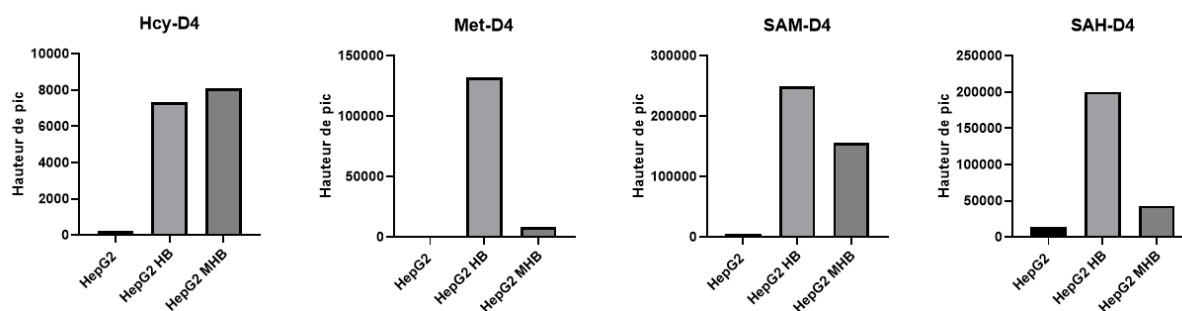


Figure 66 : Test d'incorporation *in vivo* sur cellules HepG2 d'homocystéine deutérée.

Les cellules HepG2 ont été incubées pendant 72 dans un milieu classique (HepG2), dans un milieu avec Hcy-D4 avec méthionine (MHB) et dans un milieu avec Hcy-D4 sans méthionine. Après extraction protéique totale et analyse LCMS/MS, l'homocystéine deutérée (Hcy-D4), la méthionine deutérée, la SAM deutérée (SAM-D4) et la SAH deutérée (SAH-D4) ont été mesurées. Les résultats sont représentés via la mesure de la hauteur du pic au spectromètre de masse. N=1, N=1.

Par la suite, nous avons mis au point une méthode d'incorporation *in vitro* basée sur le protocole d'incorporation du 5-[¹⁴C]meTHF. Nous avons réalisé un mélange réactionnel contenant les extraits protéique totaux de HepG2 cultivées en milieu classique, du 5-meTHF, de l'Hcy-D4, de la vitamine B12 et C et de l'ATP. Les échantillons ont été divisés en plusieurs tubes visant à réaliser une cinétique de réaction pour déterminer le temps optimal d'incubation (30, 60, 90, 120, 180, 240, 300 et 360 minutes). Nous avons pu observer que

l'Hcy-D4 était rapidement incorporée dans les cellules avec une augmentation croissante jusqu'à 90 minutes. Concernant la Met-D4 et la SAH-D4, on remarque là aussi une augmentation de la production de ces métabolites jusqu'à 90 minutes suivi d'une phase stationnaire. Pour la SAM-D4, nous avons observé une forte difficulté à détecter ce métabolite quel que soit le temps d'incubation avec des valeurs mesurées proches du bruit de fond de l'appareil. Ces résultats ont mis en lumière qu'une incubation, jusqu'à 90 minutes semblait optimale pour observer les différents métabolites deutérés produits (*Figure 67*).

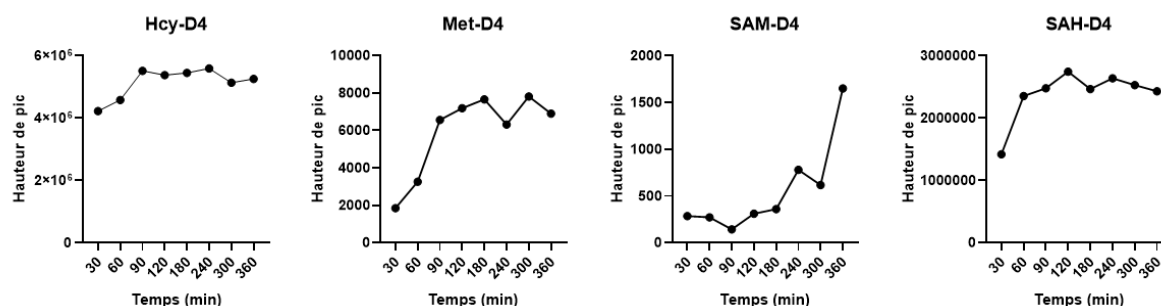


Figure 67 : Cinétique sur 6h d'incorporation d'homocystéine deutérée in vitro sur 100 µg de protéines totales HepG2.

Les extraits protéiques totaux ont été incubés avec un mélange réactionnel contenant de l'Hcy-D4 pendant 6h et les échantillons ont été récoltés à 30, 60, 90, 120, 180, 240, 300 et 360 minutes. Les différents échantillons ont été analysés par LCMS/MS avec la mesure de l'homocystéine deutérée (Hcy-D4), la méthionine deutérée, la SAM deutérée (SAM-D4) et la SAH deutérée (SAH-D4). Les résultats sont représentés via la mesure de la hauteur du pic au spectromètre de masse en fonction du temps d'incubation. N=1, N=1.

En parallèle de ce test d'incorporation d'Hcy-D4, nous avons voulu tester l'incorporation *in vitro* de méthionine deutérée (Met-D3) possédant 3 deutériums au niveau du groupement méthyle afin de montrer que les MATs sont bien actives dans le noyau et qu'elles peuvent synthétiser de la SAM à partir de méthionine marquée. Nous avons là aussi réalisé une cinétique de réaction enzymatique sur 1h40 avec une récolte des échantillons à 20, 40, 60, 80 et 100 minutes. Nous avons cette fois réalisée une très belle mesure de la SAM-D3. Cependant, ce résultat témoigne uniquement de l'activité enzymatique des MATs et ne prouve pas que la SAM est produite à partir de la méthionine synthétisée *de novo* (*Figure 68*).

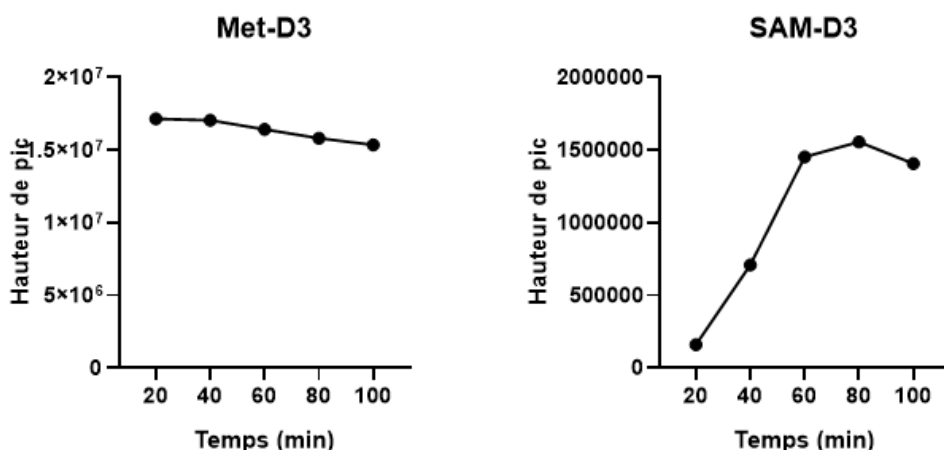


Figure 68 : Cinétique d'incorporation de méthionine deutérée (Met-D3) in vitro sur 100 µg de protéines totales HepG2.

Les extraits protéiques totaux ont été incubés avec un mélange réactionnel contenant de la Met-D3 pendant 1h40 et les échantillons ont été récoltés à 20, 40, 60, 80 et 100 minutes. Les différents échantillons ont été analysés par LCMS/MS avec la mesure de la méthionine deutérée (Met-D4) et de la SAM deutérée (SAM-D4). Les résultats sont représentés via la mesure de la hauteur du pic au spectromètre de masse en fonction du temps d'incubation. N=1, N=1.

Grace au 3 tests précédents, nous avons pu mettre au point le protocole d'incorporation d'Hcy-D4 sur extraits protéiques totaux et nous avons déterminé que 60 minutes semblaient le meilleur temps d'incubation pour mesurer la réaction enzymatique. Cependant, nous avons eu de fortes difficultés à mesurer la SAM-D4 dans nos échantillons témoignant potentiellement que l'excès d'Hcy-D4 dans la réaction active préférentiellement la voie dépendante de la SAHH afin de produire de la SAH-D4 plutôt que la voie de reméthylation via la MS. De plus, cette suractivation de la voie de la SAHH a pour conséquence de réguler négativement les MATs pour diminuer la production de SAM-D4. Nous avons donc décidé de reproduire notre test en inhibant la SAH hydrolase avec de l'AdoX. De plus, nous avons commencé à tester cette incorporation sur fractions cytoplasmiques et nucléaires des HepG2. Sachant que cette expérience demande une forte quantité de protéine (au minimum 100 µg), nous avons pris la décision de tester une ultrafiltration des échantillons afin de concentrer les protéines. De plus, cette étape d'ultrafiltration permet de débarrasser les échantillons des métabolites non marqués afin de ne pas encombrer le signal du spectromètre de masse. Nous avons pu mettre en évidence une forte diminution de la mesure de la SAH après traitement à l'AdoX témoignant donc d'une bonne inhibition de la SAHH par ce composé. Or, cette inhibition de la SAHH n'a pas permis d'améliorer la mesure de la SAM-D4. Cependant, nous avons pu observer une nette amélioration des mesures de SAM-D4 après ultrafiltration (Figure 69). Prises dans leur ensemble, ces données nous ont permis de mettre au point un protocole d'incorporation à l'homocystéine deutérée sur fractions cytoplasmiques et nucléaires et sur extraits protéiques totaux en déterminant un temps d'incubation de 60 minutes et la nécessité de réaliser une étape d'ultrafiltration des échantillons avant l'incorporation.

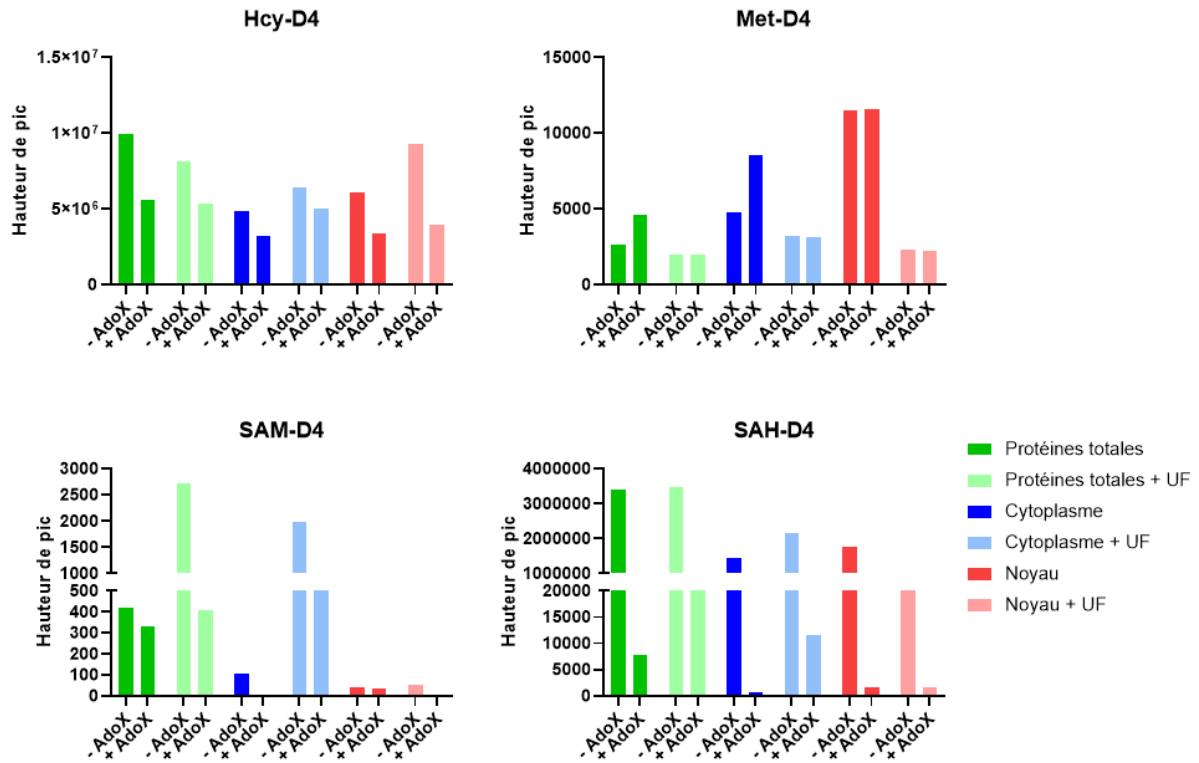


Figure 69 : Incorporation d'homocystéine deutérée in vitro pendant 60 minutes sur extraits protéiques totaux, fractions cytoplasmiques et nucléaires HepG2 avec ou sans traitement AdoX et avec ou sans ultrafiltration.

Les extraits protéiques totaux, les fractions cytoplasmiques et nucléaires ont été incubés avec un mélange réactionnel contenant de l'Hcy-D4 pendant 60 minutes en présence ou non d'AdoX un inhibiteur de la SAH hydrolase et avec ou non ultrafiltration (UF) préalable. Les différents échantillons ont été analysés par LCMS/MS avec la mesure de l'homocystéine deutérée (Hcy-D4), de la méthionine deutérée (Met-D4), de la SAM deutérée (SAM-D4) et de la SAH deutérée (SAH-D4). Les résultats sont représentés via la mesure de la hauteur du pic au spectromètre de masse. N=1, N=1.

Partie 3 : Les interactions protéine-protéine impliquant la méthionine synthase

Suite à la mise en évidence de la localisation nucléaire de la méthionine synthase et d'autres enzymes du cycle de la méthionine, et de l'activité enzymatique nucléaire de la MS, nous nous sommes intéressés aux interactions protéine-protéine impliquant la MS dans les différents compartiments subcellulaires. Il est déjà connu que la MS interagit naturellement avec la méthionine synthase réductase qui est l'enzyme permettant la réactivation du cycle en réduisant la vitamine B12 oxydée via le transfert d'un groupement méthyle en provenance de la SAM. De plus, il a été mis en évidence par le laboratoire, que la MS interagit avec deux protéines cytoplasmiques de transport de la vitamine B12 qui sont MMACHC et MMADHC. Dans cette partie, nous nous sommes penchés sur les interactions pouvant impliquer les méthionines adénosyltransférases (MATs) ainsi que des méthyltransférases (MT) comme des DNA méthyltransférases (DNMT). Ces potentielles interactions ont été étudiées dans le compartiment cytoplasmique et dans le compartiment nucléaire des cellules HepG2, des fibroblastes contrôles et des fibroblastes de patients CblG, CblC et CblE. Dans un premier temps les interactions ont été mises en évidence par co-immunoprécipitation suivi par des western blot, puis les interactions les plus prometteuses ont été confirmées par Duolink® Proximity Ligation Assay.

I. Etude des interactions protéine-protéine impliquant les MATs et la MS

A. Interactions protéine-protéine mises en évidence par co-immunoprécipitation et Western blot

Après co-immunoprécipitation de la MS avec un anticorps spécifique, nous avons réalisé une série de western blot afin d'investiguer de potentielles interactions protéine-protéine. Les enzymes MATs étant au nombre de trois et composées de sous-unités régulatrices et catalytiques nous avons étudié MAT α 1, la sous-unité catalytique de l'enzyme MAT I et MAT III uniquement exprimé dans le foie, ainsi que MAT α 2 la sous-unité catalytique et MAT β la sous-unité régulatrice de l'enzyme MAT II. MAT α 2 et MAT β ont été analysées dans toutes les lignées cellulaires et MAT α 1 uniquement dans les cellules HepG2.

Dans un premier temps, nous avons confirmé la co-immunoprécipitation de la MS en réalisant un western blot contre cette protéine avec un autre anticorps. L'absence de la protéine dans les inputs des fractions nucléaires indique une très faible expression de l'enzyme dans ce compartiment. L'immunoprécipitation de la MS suivi d'un western blot contre cette même protéine a permis d'amplifier le signal obtenu dans les fractions nucléaires et donc de confirmer la présence nucléaire de cette dernière. Par la suite, les échantillons immunoprécipités avec un anticorps anti-MS ont été utilisés en western blot sur les différentes sous-unités MATs. Nos résultats confirment la double localisation, cytoplasmique

et nucléaire de la MS et de MAT α 2, et révèlent une nouvelle interaction protéine-protéine dans chacun des compartiments subcellulaires entre la MS et MAT α 2 (Figure 71).

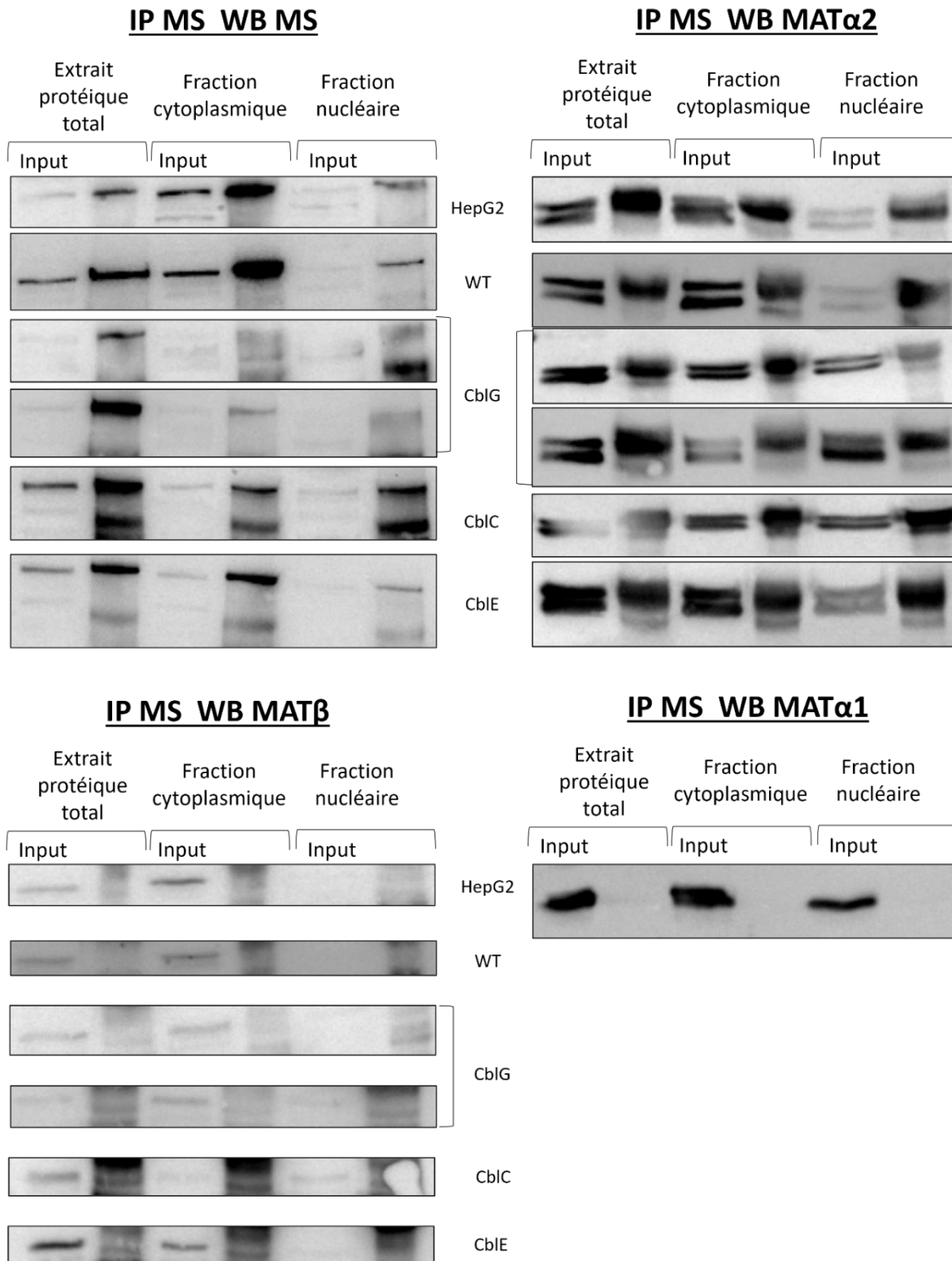


Figure 70 : Co-immunoprécipitation de la méthionine synthase et analyse de potentielles interactions avec les sous-unités MATs.

Des extraits protéiques totaux, des fractions cytoplasmiques et nucléaires de cellules HepG2, de fibroblastes contrôles et de fibroblastes de patients CbIG, CbIC et CbIE ont été co-immunoprécipités avec un anticorps contre la MS et des western blots contre la MS avec un autre anticorps ainsi que contre les MATs ont été réalisés. (N=3)

Sachant que MAT α 1 est uniquement exprimée dans les hépatocytes matures, nous avons réalisé un western blot contre cette protéine sur les échantillons immunoprécipités avec la MS comme contrôle d'expérience. Nous avons aussi réalisé un western blot contre la sous-unité régulatrice MAT β et nous n'avons pas montré d'interaction entre la MS et MAT α 1 ou entre la MS et MAT β dans les différentes lignées cellulaires (*Figure 70*).

Par la suite nous avons souhaité étudier l'interaction entre la MS et MAT α 2 dans l'autre sens afin de confirmer ce que nous avons obtenu précédemment. Nous avons donc réalisé une co-immunoprécipitation de MAT α 2 dans des extraits protéiques totaux, dans des fractions cytoplasmiques et nucléaires de cellules HepG2, des fibroblastes contrôles et des fibroblastes de patients CblG et CblC. Pour la suite des expériences nous avons fait le choix de focaliser nos analyses uniquement sur les cellules HepG2, les fibroblastes contrôles et de patients CblG afin de réduire le temps de culture cellulaire et de pouvoir tester d'autres partenaires protéiques.

Dans un premier temps, nous avons réalisé la co-immunoprécipitation de MAT α 2 suivi d'un western blot contre cette même protéine avec un autre anticorps afin de confirmer l'immunoprécipitation. Nous avons de nouveau confirmé la localisation cytoplasmique et nucléaire de MAT α 2 dans toutes les lignées cellulaires étudiées. Par la suite, nous avons réalisé un western blot contre la MS sur les échantillons immunoprécipités contre MAT α 2 et nous avons pu de nouveau mettre en évidence la localisation nucléaire de la MS mais aussi son interaction avec MAT α 2 dans les deux compartiments subcellulaires de toutes les lignées. Sachant que le partenaire de MAT α 2 est MAT β nous avons souhaité tester si cette interaction était retrouvée dans le compartiment nucléaire. Les échantillons co-immunoprécipités pour MAT α 2 ont subi un western blot contre MAT β ce qui nous a permis de montrer que l'interaction se produisait dans le cytoplasme mais aussi dans le noyau. De plus, nous pouvons observer que l'interaction nucléaire est plus légère que dans le cytoplasme. Enfin, puisque le partenaire le plus connu de la MS est la MSR, nous avons souhaité savoir si MAT α 2 pouvait interagir avec la MSR en plus de la MS. Les extraits protéiques totaux ainsi que les fractions cytoplasmiques et nucléaires des cellules HepG2, des fibroblastes contrôles et de patients CblG et CblC immunoprécipités avec un anticorps anti-MAT α 2 ont subi un western blot contre la MSR. Nous avons pu confirmer la localisation nucléaire de la MSR mais nous n'avons pas mis en évidence d'interaction claire entre ces deux protéines avec uniquement une présence de « smear » sans bande distincte (*Figure 71*).

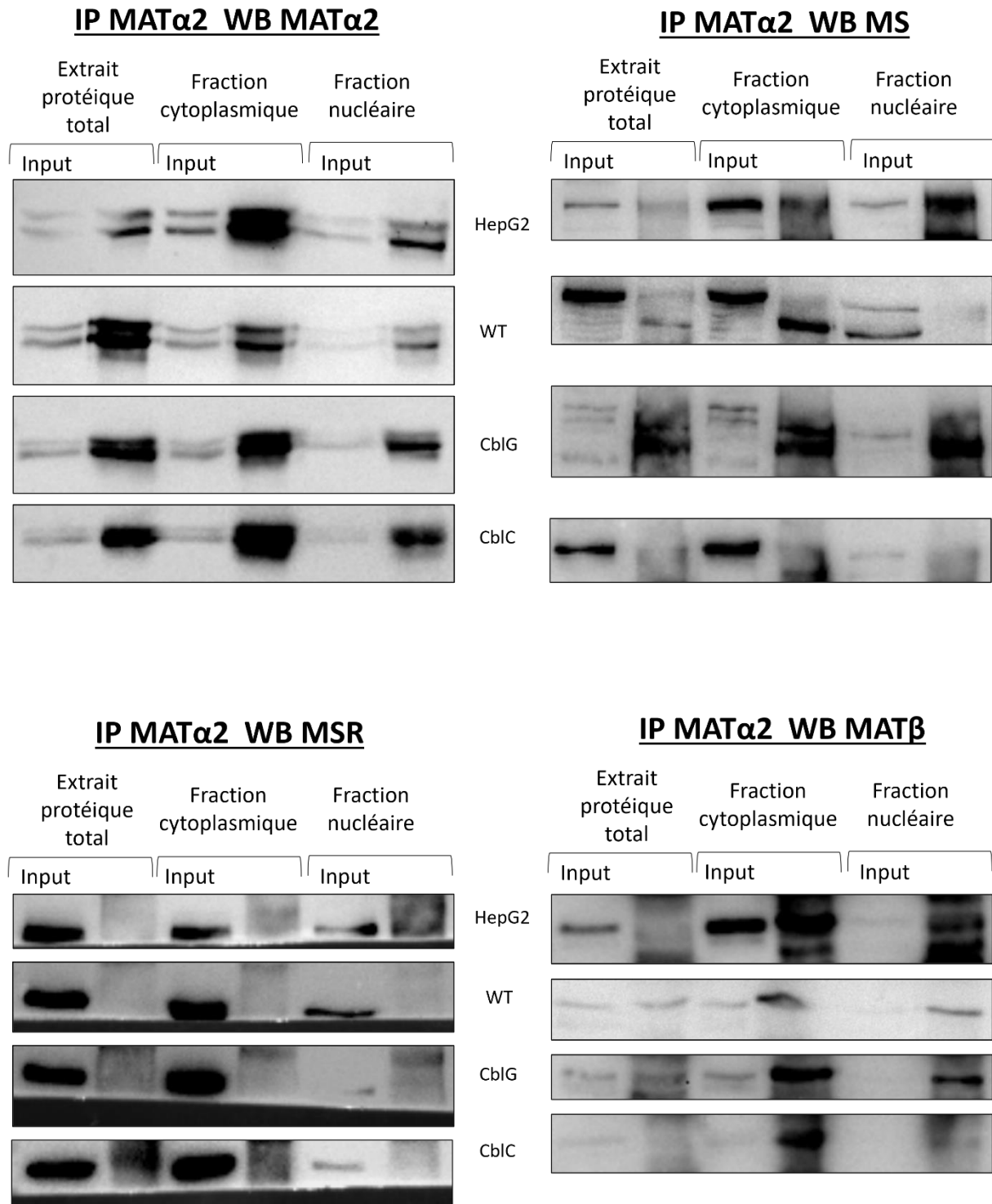


Figure 71 : Co-immunoprécipitation de MAT α 2 et analyse des potentielles interactions avec MAT β , MSR et MS.

Des extraits protéiques totaux, des fractions cytoplasmiques et nucléaires de cellules HepG2, de fibroblastes contrôles et de fibroblastes de patients CbIG et CbIC ont été co-immunoprécipités avec un anticorps contre MAT α 2 et des western blots contre MAT α 2 avec un autre anticorps ainsi que contre MAT β , la MS et la MSR ont été réalisés. (N=3)

Suite à ces différentes séries de co-immunoprécipitations suivies de western bot, nous avons donc mis en lumière une toute nouvelle interaction impliquant la MS et MAT α 2 dans le cytoplasme mais aussi dans le noyau des cellules HepG2, des fibroblastes contrôles et de patients CblG, CblC et CblE.

Nous nous sommes ensuite penchés sur un problème potentiel impliquant le compartiment mitochondrial. En effet, suite aux vérifications du bon fractionnement de nos cellules, nous nous sommes posé la question du devenir de ces organelles dans nos fractions. Nous nous sommes donc demandé s'il était possible que la fraction nucléaire soit contaminée par des mitochondries. La mitochondrie étant le siège de nombreuses réactions métaboliques dont le cycle des monocarbone, nous nous sommes donc intéressés à la citrate synthase comme marqueur mitochondrial. Pour ce faire, nos diverses fractions cytoplasmiques et nucléaires ont été analysés en WES pour un marqueur cytoplasmique, la vinculine, deux marqueurs nucléaires, les lamines 1 et 2, et un marqueur mitochondrial, la citrate synthase (*Figure 72*).

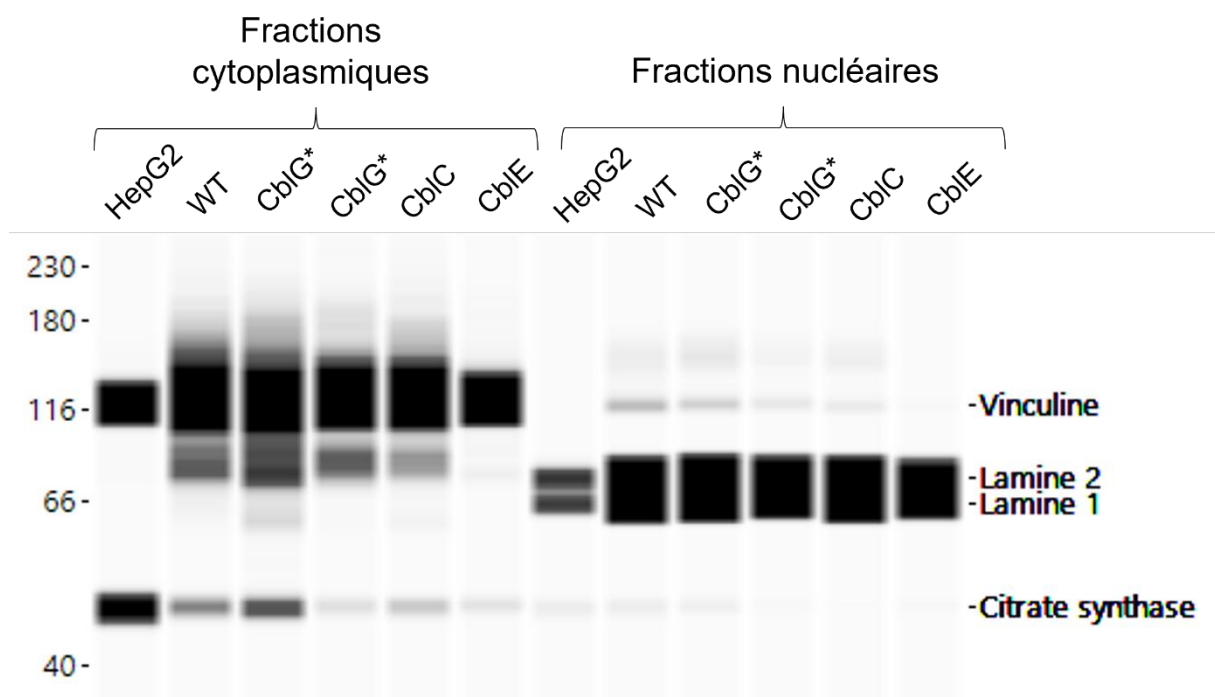


Figure 72 : Visualisation par WES d'une contamination mitochondriale des fractions cytoplasmiques et nucléaires.

Les différentes fractions cytoplasmiques et nucléaires ont subi un WES contre la vinculine (marqueur cytoplasmique), les lamines (marqueur nucléaire) et la citrate synthase (marqueur mitochondrial) afin de vérifier l'efficacité du fractionnement réalisé avec le kit NE-PER®. N=3.

Nous avons mis en évidence la présence de la citrate synthase et donc d'un marqueur mitochondrial dans les fractions cytoplasmiques mais aussi dans les fractions nucléaires. Au vu de ces résultats, nous avons modifié le protocole de fractionnement. Nous avons testé l'ajout d'une étape de « lavage » entre l'étape d'extraction cytoplasmique et l'étape d'extraction nucléaire en réalisant deux fois de suite l'étape d'extraction cytoplasmique. Nous avons aussi diminué la vitesse de centrifugation de 16 000 g à 10 000 g afin d'éviter aux débris mitochondriaux de se retrouver dans le culot nucléaire. Enfin, nous avons combiné ces deux

modifications du protocole. Après avoir mis en œuvre ces différentes modifications, nous avons réalisé un WES de la citrate synthase dans les fractions cytoplasmiques et nucléaires (*Figure 73*).

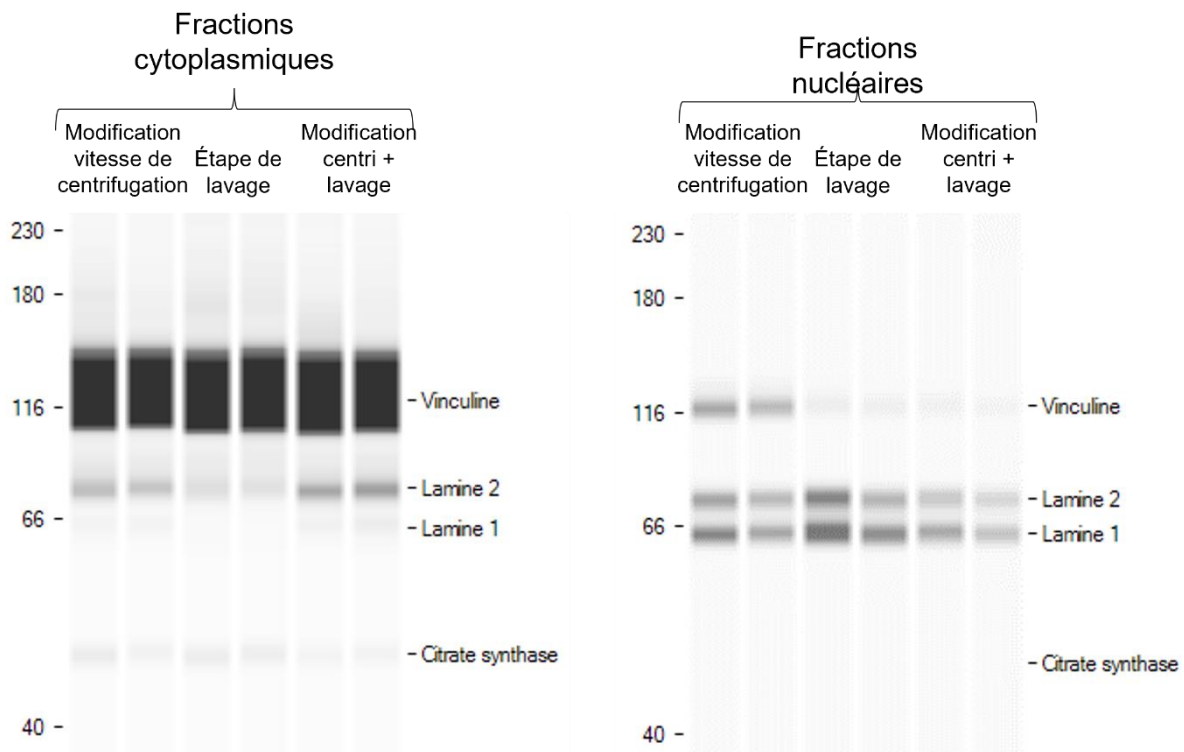


Figure 73 : WES citrate synthase après modification du protocole de fractionnement en modifiant la vitesse de centrifugation et/ou en ajoutant une étape de lavage.

Les différentes fractions cytoplasmiques et nucléaires ont subi un WES contre la vinculine (marqueur cytoplasmique), les lamines (marqueur nucléaire) et la citrate synthase (marqueur mitochondrial) afin de vérifier le fractionnement réalisé avec le kit NE-PER®. N=3.

Grâce à ces différentes modifications, nous avons réussi à éliminer les contaminations mitochondriales dans les fractions nucléaires. La combinaison modification de la vitesse de centrifugation et étape de lavage semble être la meilleure solution pour éliminer les contaminations mitochondriales tout en évitant aussi les contaminations cytoplasmiques. Grâce à ces différentes modifications et vérifications nous avons pu montrer que le fractionnement était propre et efficace et nous avons réussi à nous affranchir de la contamination mitochondriale (*Figure 73*).

Suite à cette interrogation, nous avons de nouveau réalisé une co-immunoprécipitation de la MS suivi d'un western blot contre cette dernière et contre MAT α 2 afin de vérifier que les données obtenues précédemment n'était pas dues à la contamination mitochondriale sur des fibroblastes contrôles (*Figure 74*).

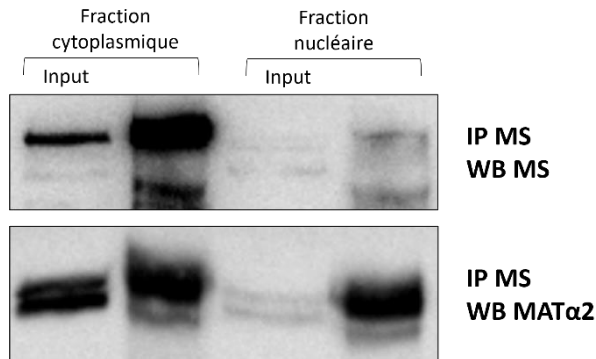


Figure 74 : Co-immunoprécipitation de la MS et western blot contre la MS et MAT α 2 après modification du protocole de fractionnement.

Des fractions cytoplasmiques et nucléaires de fibroblastes contrôles ont été co-immunoprécipitées avec un anticorps contre la MS et des western blot contre la MS avec un autre anticorps ainsi que contre MAT α 2 ont été réalisés. (N=3)

Nous avons pu confirmer la localisation nucléaire de la MS et de MAT α 2 ainsi que leur interaction protéine-protéine après modification du protocole de fractionnement témoignant donc que les contaminations mitochondriales n'avaient pas d'impact sur nos données précédentes.

B. Interactions protéine-protéine mis en évidence par Duolink® Proximity Ligation Assay

Afin de confirmer la nouvelle interaction protéine-protéine entre la MS et MAT α 2 ainsi que sa localisation subcellulaire, nous avons réalisé un Duolink® Proximity Ligation Assay. Cette expérience a pour but de visualiser une interaction entre deux protéines par microscopie confocale. En effet, lorsque deux protéines sont distantes de moins de 40 nm, les anticorps utilisés ainsi que les sondes fluorescentes reconnaissant ces anticorps vont s'appareiller et aboutir à la formation d'un spot lumineux rouge témoignant de la forte proximité entre les deux partenaires, pouvant s'apparenter à une interaction. De plus, cette technique permet de quantifier cette interaction dans les différents compartiments subcellulaires. Cette expérience a été réalisée sur des fibroblastes contrôles et sur des fibroblastes CblG en utilisant un anticorps contre la MS et un anticorps provenant d'un autre hôte contre MAT α 2.

Nous avons pu mettre en évidence par microscopie confocale un signal positif dans les deux lignées cellulaires ce qui confirme l'existence d'interaction protéine-protéine entre ces deux protéines dans le cytoplasme et dans le noyau. Par la suite, nous avons étudié les conséquences de mutations du gène *MTR* sur ces interactions avec MAT α 2 en mesurant *in situ* l'interaction dans des fibroblastes CblG. Nos résultats montrent clairement que la diminution de l'expression de la MS induit une diminution significative de l'interaction avec MAT α 2 ($p < 0,001$) dans le cytoplasme des cellules CblG. Ce résultat n'est pas significatif dans le noyau de ces cellules suggérant potentiellement un mécanisme adaptatif pour maintenir les niveaux de SAM dans le noyau (*Figure 75*).

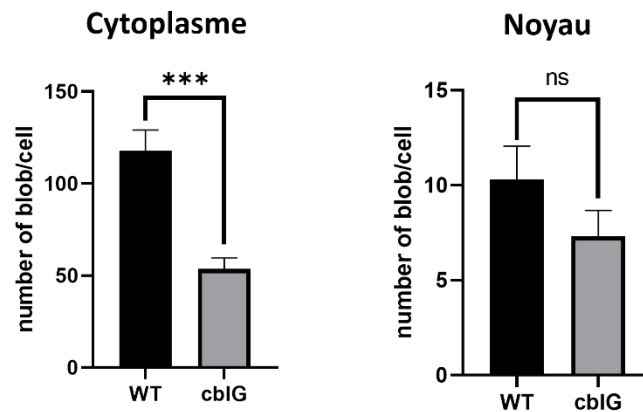
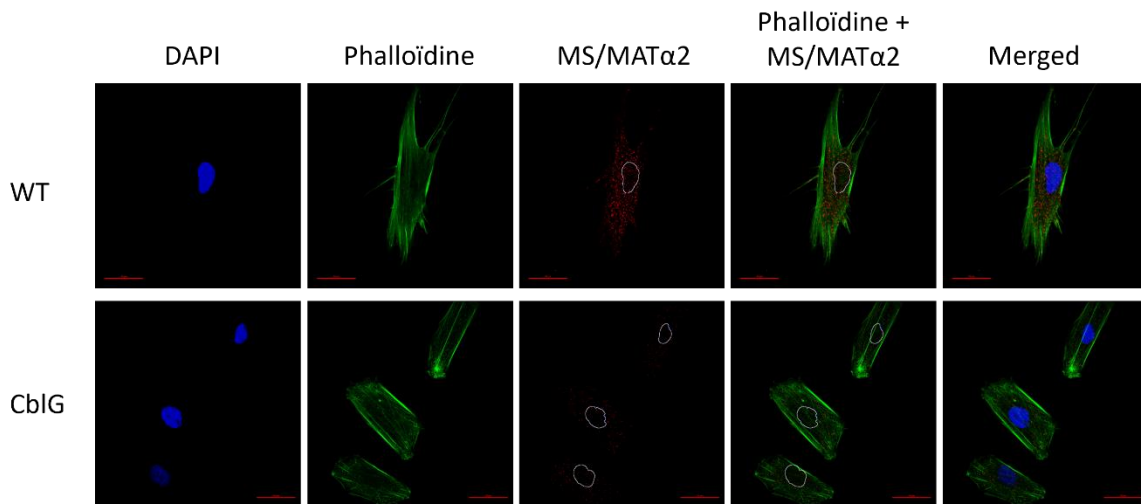


Figure 75 : Confirmation de l'interaction entre la méthionine synthase et MATα2.

Un Duolink® Proximity Ligation Assay a été réalisé sur des fibroblastes contrôles et CblG. Les points rouges indiquent les interactions protéine-protéine entre la MS et MATα2. Les deux graphiques représentent la quantification du nombre de spots rouges dans le cytoplasme ou dans le noyau de chaque cellule réalisé grâce au logiciel BlobFinder. Les résultats sont représentés sous la forme de moyenne ± SEM, N=3 ; *** p<0,001 ; Two-way ANOVA ; GraphPad.

Pour conclure cette partie sur les interactions entre la MS et les sous-unités MATs, nous avons pu dans un premier temps conforter nos résultats observés en IF concernant la localisation nucléaire de la méthionine synthase. Dans un second temps, nous avons pu mettre en évidence une nouvelle interaction protéique impliquant la méthionine synthase avec la sous-unité MATα2. Cette interaction a pu être observée (IP et Duolink) dans le cytoplasme des cellules mais aussi dans les noyaux. L'interaction entre la MS et MATα2 conforte donc nos données sur la localisation subcellulaire de ces 2 partenaires protéiques et met en évidence un interactome nucléaire permettant la synthèse de méthionine et de SAM directement dans le noyau.

II. Etude des interactions protéine-protéine impliquant les DNA méthyltransférases et la MS

Dans le but d'investiguer si l'interaction nucléaire entre la MS et MAT α 2 pourrait faire partie d'un interactome physique avec des méthyltransférases utilisatrices de SAM, nous avons étudié leurs potentielles interactions avec les ADN méthyltransférases DNMT3b, qui catalyse la méthylation *de novo* du double brin d'ADN, et DNMT1, qui est responsable du maintien de la méthylation post-réplivative.

Nous avons soumis des extraits protéiques totaux, des fractions cytoplasmiques et nucléaires de cellules HepG2, des fibroblastes contrôles et de fibroblastes de patients CblG à une co-immunoprécipitation de la MS suivie d'un western blot avec un autre anticorps contre cette protéine afin de confirmer l'immunoprécipitation de cette dernière. Nous avons ensuite étudié de potentielles interactions avec les DNMT. La co-immunoprécipitation de la MS suivie d'un western blot contre DNMT1 dans les extraits protéiques totaux, les fractions cytoplasmiques et nucléaires n'a pas mis en évidence d'interaction entre ces deux protéines (*Figure 76*).

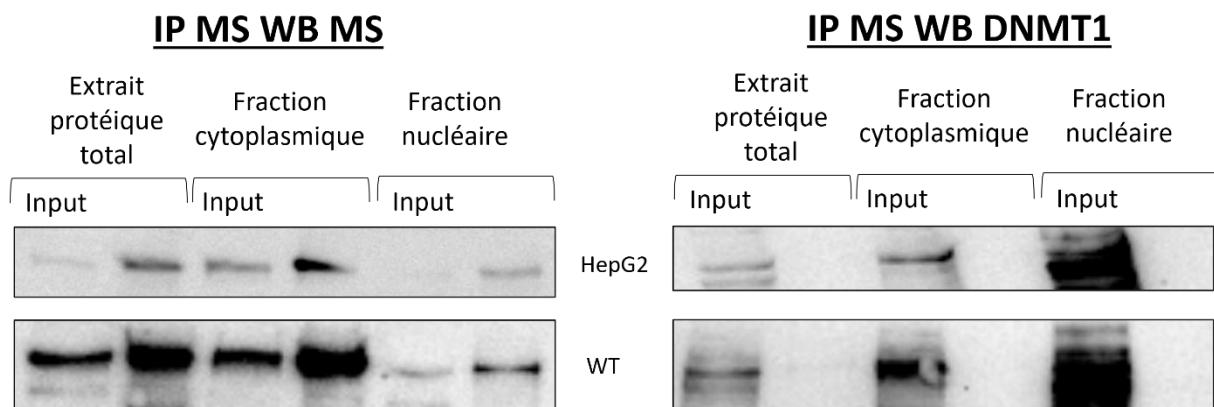


Figure 76 : Interaction protéine-protéine entre la méthionine synthase et DNMT1 par immunoprécipitation et western blot.

Des extraits protéiques totaux, des fractions cytoplasmiques et nucléaires de cellules HepG2 et de fibroblastes contrôles ont été co-immunoprécipités avec un anticorps contre la MS et des western blot contre la MS avec un autre anticorps ainsi que contre DNMT1 ont été réalisés. (N=3)

Ensuite, les échantillons co-immunoprécipités avec un anticorps contre la MS ont subi un western blot contre DNMT3b, l'ADN méthyltransférase responsable de la méthylation de l'ADN *de novo*. Nous avons pu encore une fois confirmer notre immunoprécipitation de la MS ainsi que sa double localisation cytoplasmique et nucléaire dans les cellules HepG2, dans les fibroblastes contrôles et dans les fibroblastes de patients CblG. De plus, nos résultats ont révélé une nouvelle interaction entre la MS et DNMT3b dans les extraits protéiques totaux, dans les fractions cytoplasmiques et dans les fractions nucléaires des trois lignées de cellules (*Figure 77*).

Par la suite, nous avons investigué l'interaction potentielle entre MAT α 2 et DNMT3b. Les extraits protéiques totaux, les fractions cytoplasmiques et nucléaires ont été co-immunoprécipités avec un anticorps contre MAT α 2 et soumis à un western blot contre DNMT3b. Nos résultats confirment la localisation nucléaire de MAT α 2 et indiquent que MAT α 2 et DNMT3b interagissent dans le compartiment cytoplasmique et dans le compartiment nucléaire (*Figure 77*).

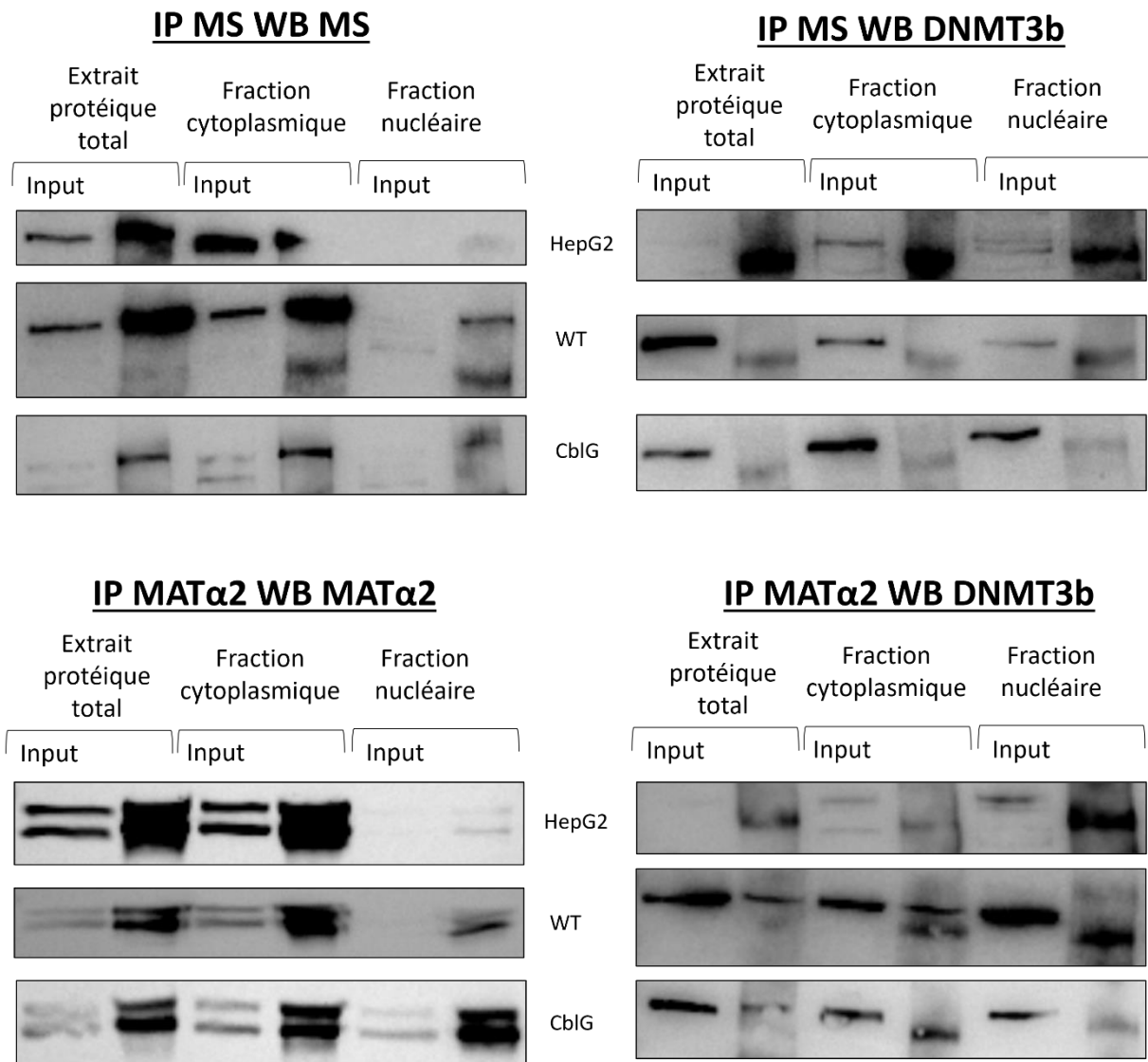


Figure 77 : Mise en évidence de l'interaction protéine-protéine entre la méthionine synthase, MAT α 2 et DNMT3b.

Des extraits protéiques totaux, des fractions cytoplasmiques et nucléaires de cellules HepG2, de fibroblastes contrôles et de fibroblastes CblG ont été co-immunoprécipités avec un anticorps contre la MS et contre MAT α 2 et des western blot contre la MS et contre MAT α 2 avec un autre anticorps ainsi que contre DNMT3b ont été réalisés. (N=3)

Pris dans leur ensemble, ces résultats suggèrent que l'interaction entre MAT α 2 et DNMT3b permet une production de SAM directement où le groupement méthyle est nécessaire pour méthyler *de novo* l'ADN. De plus, l'interaction entre la MS et MAT α 2, et entre la MS et DNMT3b dans le noyau suggèrent l'existence d'un interactome composé de ces trois protéines et éventuellement d'une canalisation du substrat de la méthionine et de la SAM, couplant le

cycle de la méthionine à la production de SAM et son utilisation pour la méthylation de l'ADN. Enfin, nous posons donc l'hypothèse que la MS et MAT α 2 pourraient potentiellement interagir avec d'autres méthyltransférases utilisant la SAM pour méthyler des cibles nucléaires comme l'ADN ou les histones (*Figure 78*).

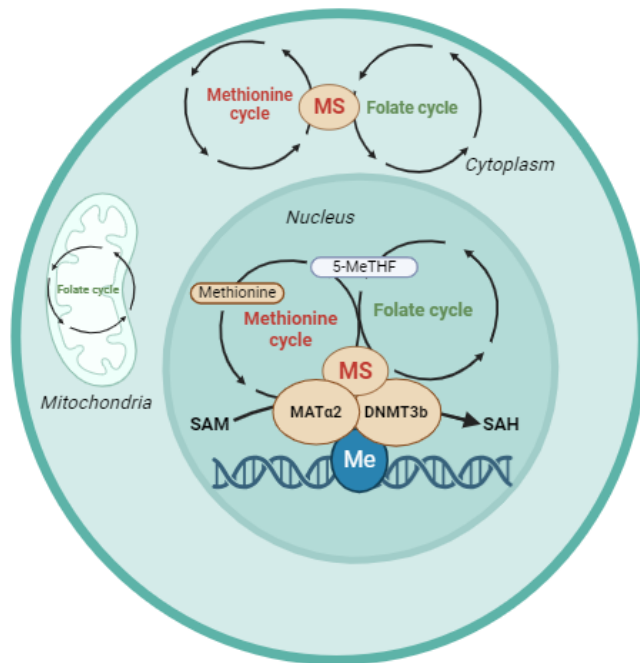


Figure 78 : Schéma bilan récapitulant les avancées obtenues par le travail de thèse.

Partie 4 : Etude des effets de l'activation pharmacologique de SIRT1 sur les interactions entre MAT α 2, MAT β et SIRT1

Pour finir, nous avons souhaité étudier les effets de l'activation pharmacologique de SIRT1 sur les interactions protéine-protéine entre MAT α 2, MAT β et SIRT1. En effet, de récentes études menées au laboratoire ont démontré que la carence en vitamine B12 ou des défauts génétiques impactant le métabolisme de la cobalamine induisent un stress cellulaire, incluant un stress du réticulum endoplasmique dépendant de SIRT1. Ce stress déclenche une modification de la navette nucléocytoplasmique de la protéine liant les ARNm (RBP) HuR, ayant pour conséquence une localisation aberrante de HuR, ce qui impacte le métabolisme des ARNm et la régulation de l'expression des gènes. Ce problème de localisation serait dû à des altérations des modifications post-traductionnelles de HuR (méthylation et phosphorylation) (Battaglia-Hsu et al. 2018). De plus, il a été montré par le laboratoire, que l'activation pharmacologique de SIRT1 par le SRT1720 (un activateur synthétique de SIRT1 ou STAC) réduit le stress du réticulum endoplasmique et restaure la localisation de HuR. Cet activateur pharmacologique a aussi été testé sur des souris transgéniques déficientes en méthionine synthase et a permis de réduire leurs défauts cognitifs (Rose Ghemrawi et al. 2019). Enfin, comme mentionné en introduction, il a été montré dans la littérature en 2013 que HuR interagit avec MAT β et SIRT1 et qu'un traitement au resvératrol ne stimule pas uniquement l'expression de SIRT1 mais promeut la transcription du gène *MAT2B* et augmente la transcription de *HuR*. De plus, cette stimulation renforce la stabilité de ce complexe à trois protéines en déstabilisant l'interaction entre MAT β et MAT α 2 (Yang et al. 2013b). Dans ce contexte, nous avons donc souhaité étudier les interactions entre MAT α 2, MAT β et SIRT1 dans des cellules HepG2, des fibroblastes contrôles et des fibroblastes CblG avant et après traitement avec l'activateur pharmacologique de SIRT1, SRT2104. Nous avons donc émis l'hypothèse que l'activation pharmacologique de SIRT1 pourrait promouvoir les interactions entre SIRT1/MAT β . Ces interactions en favorisant la dissociation de MAT β /MAT α 2 pourraient conduire à augmenter la synthèse de SAM. Ce travail a été réalisé lors du stage de Master 2 de Mme Zeinab Alsahly, que j'ai pu encadrer, former et co-superviser.

I. Le traitement au SRT2104 impacte-t-il la viabilité cellulaire ?

Le SRT2104, un activateur pharmacologique ciblant spécifiquement la déacétylase SIRT1 est utilisé depuis quelques années au laboratoire. Les études antérieures menées à l'unité utilisaient le SRT1720 mais il s'est avéré que cette molécule présentait une certaine toxicité à forte concentration. C'est pourquoi le laboratoire a souhaité utiliser une autre molécule moins toxique. Dans un premier temps, nous avons souhaité vérifier l'absence de cytotoxicité du traitement sur des cellules HepG2 et sur des fibroblastes contrôles à des concentrations de 1, 5 et 10 μM . Les études ayant déjà utilisé le SRT2104 dans le laboratoire ont étudié les effets d'une concentration à 1 μM mais un nouveau lot ayant été commandé, nous avons tout de même souhaité vérifier l'effet de cette molécule à des concentrations plus élevées. Les cellules ont donc été traitées à différentes concentrations de SRT2104 ou de DMSO (le véhicule du SRT2104) pendant 72 h. Nous avons ensuite réalisé un test MTT (3-[4,5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényltétrazolium bromide) qui est un indicateur de l'intégrité et de l'activité mitochondriale permettant d'évaluer la cytotoxicité d'un produit. Le test MTT est habituellement utilisé pour déterminer si un produit est cytotoxique via l'observation de la viabilité mitochondriale. Ici, nous avons réalisé ce test afin de déterminer si les différentes concentrations de SRT2104 impactaient la viabilité cellulaire reflétée par l'intégrité mitochondriale et non pour étudier proprement dit la cytotoxicité. Les résultats indiquent une viabilité cellulaire de 100 % pour les cellules traitées pendant 72 h avec 1 μM et 5 μM de SRT2104. A 10 μM , nous avons pu observer une légère diminution de la viabilité et de la croissance cellulaire mais cette diminution n'est pas significative (*Figure 79*).

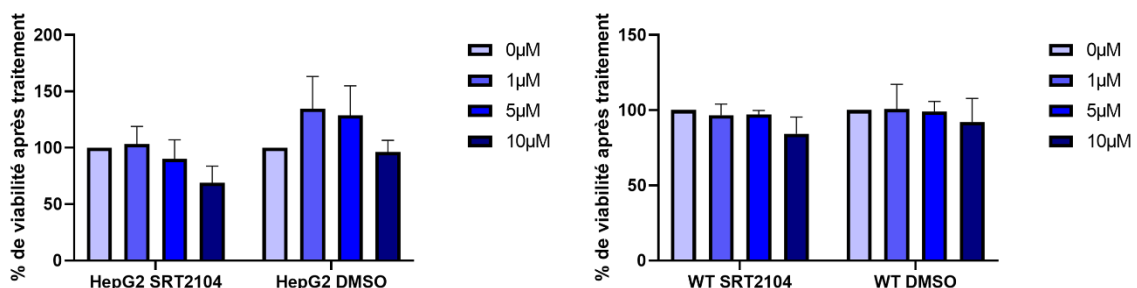


Figure 79 : Impact du traitement au SRT2104 sur la viabilité cellulaire des cellules HepG2 et des fibroblastes contrôles.

Sept mille cellules ont étéensemencées dans une plaque 12 puits. Le lendemain, les cellules ont été traitées avec les différentes concentrations de SRT2104 ou de DMSO pendant 72 h. Un test MTT a été ensuite été réalisé au bout des 72 h. Moyenne \pm écart-type, n=3, N=3 ; Two-way ANOVA avec correction Tukey, GraphPad.

Nous avons donc pu confirmer que le traitement au SRT2104 n'impacte pas la viabilité cellulaire même à une concentration de 10 μM . Pour la suite des expériences nous avons choisi la concentration de 1 μM ayant déjà été testée sur des modèles cellulaires au laboratoire.

II. Effet du traitement au SRT2104 sur le niveau protéique de SIRT1

Afin de confirmer l'activation de SIRT1 par le SRT2104, nous avons évalué le niveau protéique de SIRT1 dans des cellules HepG2 et dans des fibroblastes contrôles et de patients CblG non-traités et traités. Cette expérience n'a été réalisée qu'avec un seul réplica biologique de chaque lignée déposée en quadrupla. Cette expérience ne montre donc pas d'analyse statistique et nécessitera d'être reproduite ultérieurement. Pour cette étude nous avons réalisé une expérience de WES et les valeurs des aires sous la courbe des 4 réplicas ont été regroupées afin de calculer une moyenne.

Dans les cellules HepG2, nous avons observé une diminution significative non expliquée du niveau protéique de SIRT1 après traitement au SRT2104. Concernant le niveau de SIRT1 entre les fibroblastes contrôles et les fibroblastes CblG, nous avons observé une diminution dans les CblG comparés aux WT. De plus, nous avons pu mettre en évidence que les fibroblastes (CblG et WT) après traitement, présentaient des niveaux protéiques de SIRT1 augmentés. Cette augmentation n'est pas significative dans les cellules contrôles mais est significative dans les CblG (* $p < 0,05$) (Figure 80).

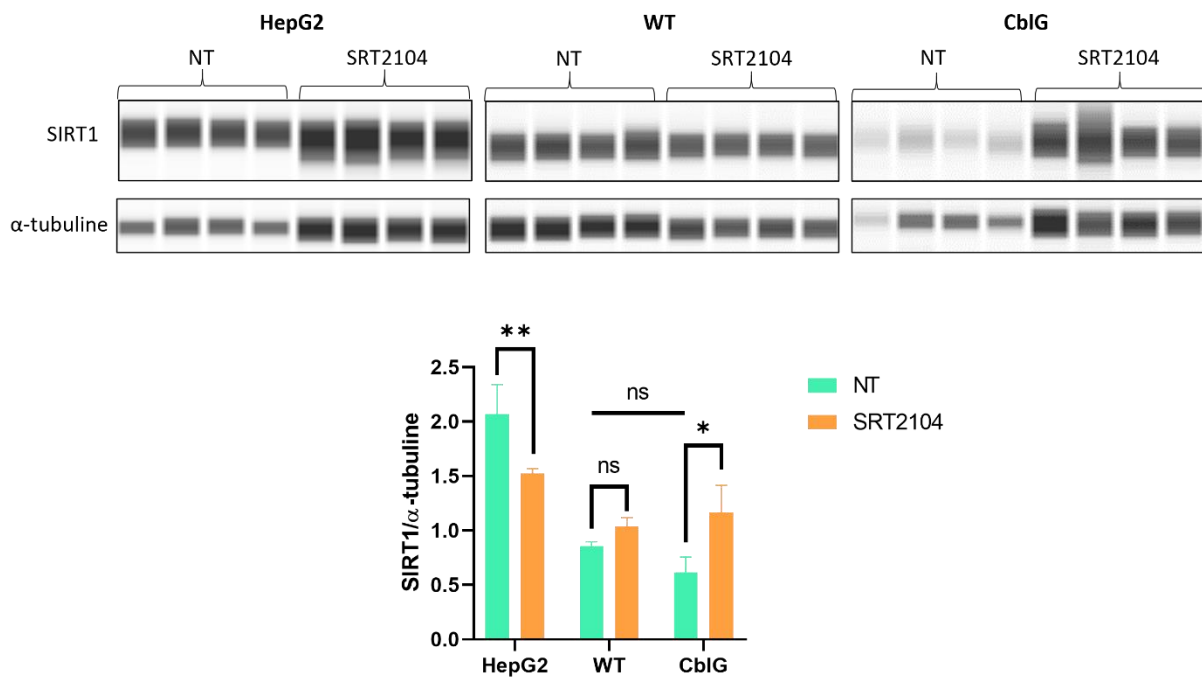


Figure 80 : Analyse du niveau protéique de SIRT1 dans des HepG2, des fibroblastes contrôles (WT) et CblG non-traités et traités au SRT2104.

Les effets de l'activation pharmacologique de SIRT1 sur le niveau protéique de SIRT1 ont été évalués par analyse WES sur les cellules HepG2, des fibroblastes contrôles (WT) et des fibroblastes CblG. Les cellules ont été incubées avec le SRT2104 à 1 μ M pendant 72 h. Le graphique représente le niveau protéique normalisé de SIRT1 par rapport à l' α -tubuline (protéine de référence). NT = non-traités. Moyenne \pm écart-type, $n=4$, * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; Two-way ANOVA avec correction Tukey, GraphPad.

Nous avons donc pu confirmer que le traitement au SRT2104 sur les fibroblastes contrôles et CblG induit une augmentation du niveau protéique de SIRT1. Cependant, nous avons mis en

évidence une diminution non attendue de SIRT1 après traitement au SRT2104 dans les HepG2. Cette expérience devra être reproduite afin de réaliser de plus amples analyses statistiques.

III. Effet de l'activation de SIRT1 par le SRT2104 sur la localisation subcellulaire de HuR et de SIRT1

Comment mentionné au début de ce chapitre, les défauts génétiques du métabolisme de la vitamine B12 sont connus pour induire une diminution de l'expression de SIRT1 et une délocalisation de HuR associés à un stress du réticulum endoplasmique (Rose Ghemrawi et al. 2019). Nous avons donc souhaité investiguer la localisation subcellulaire de HuR et de SIRT1 par marquage immunofluorescent afin de vérifier que nos cellules présentent bien un stress du réticulum endoplasmique afin de réaliser le traitement au SRT2104.

Dans les fibroblastes contrôles (WT) nous n'avons pas observé de changement de localisation subcellulaire de HuR avant et après traitement où l'on retrouve HuR de manière prédominante localisée dans le noyau. De plus, on observe que SIRT1 est elle aussi localisée au niveau nucléaire et ne semble pas subir de changement de localisation ou d'expression avant ou après traitement. Dans les cellules de patients CblG, on observe que HuR est délocalisée et est retrouvée de manière prédominante dans le cytoplasme. De plus, on observe une diminution notable du marquage de SIRT1 comparé aux cellules contrôles ce qui est concordant avec les résultats précédents de l'unité. Après traitement au SRT2104 des cellules CblG, on observe que HuR est relocalisé dans le noyau et que le marquage de SIRT1 semble plus intense (*Figure 81*).

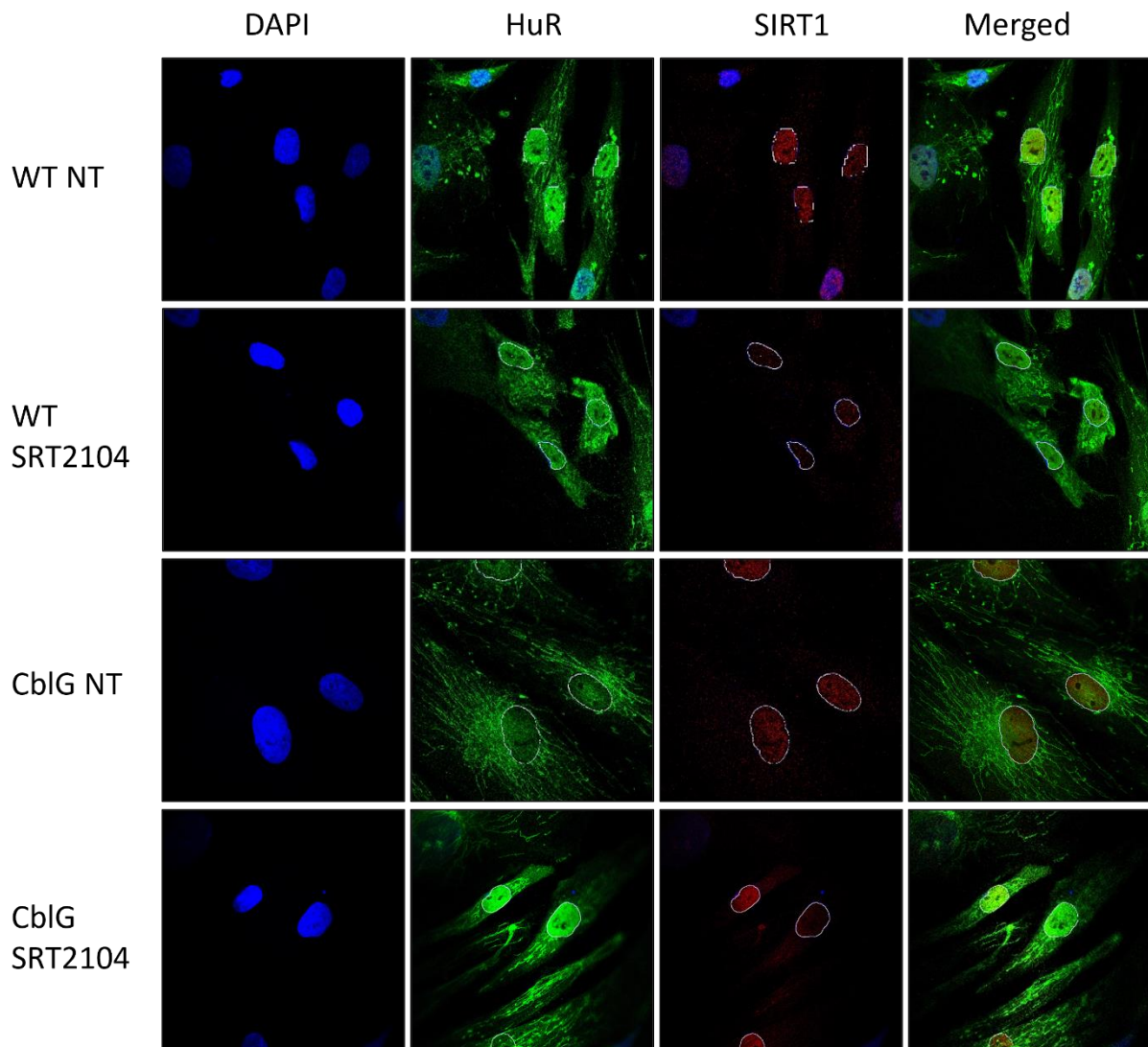


Figure 81 : Effet de l'activation pharmacologique de SIRT1 au SRT2104 sur la localisation de HuR et de SIRT1 dans les fibroblastes contrôles et CblG.

Les fibroblastes contrôles (WT) ainsi que les fibroblastes de patients CblG ont été marqués avec un anticorps contre SIRT1 et un anticorps contre HuR et visualisés et imagés au microscope confocal Nikon C2 avant et après traitement au SRT2104 à 1 μ M pendant 72 h ; N=3. Les noyaux ont été détourés via Photoshop afin de mettre en évidence le marquage nucléaire des protéines.

Cette relocalisation nucléaire de HuR après traitement au SRT2104 dans les cellules CblG ainsi que l'augmentation de l'intensité du marquage de SIRT1 confirment les résultats obtenus avec le SRT1720 précédemment reportés par le laboratoire (Rose Ghemrawi et al. 2019). Ces résultats indiquent donc que le traitement au SRT2104 à 1 μ M pendant 72 h présente un effet sur la relocalisation de HuR ainsi que sur le niveau de SIRT1 dans les cellules déficientes en méthionine synthase.

IV. Effet de l'activation pharmacologique de SIRT1 sur la synthèse de SAM

Afin d'étudier les effets de l'activation pharmacologique de SIRT1 sur la synthèse de SAM nous avons réalisé un dosage de la SAM par LC/MS-MS sur HepG2, fibroblastes contrôles et fibroblastes CblG non-traités et traités au SRT2104 à 1 μ M pendant 72 h. Cette mesure de SAM a été réalisée en trois réplicas techniques et biologiques. Comme il est décrit dans la littérature, nous avons observé une diminution significative de la SAM dans les fibroblastes CblG non-traités comparés au contrôles (WT) non-traités (** $p < 0,01$). Dans les cellules HepG2, le niveau de SAM semble rester stable avant et après traitement en montrant une valeur de 0,75 μ mol/g de protéine avant traitement et une valeur de 0,8 μ mol/g après traitement au SRT2104. Dans les fibroblastes contrôles et CblG, on observe là aussi une absence de différence significative des niveaux de SAM avant et après traitement (de 0,24 μ mol/g avant traitement à 0,25 μ mol/g après traitement au SRT2104) (Figure 82).

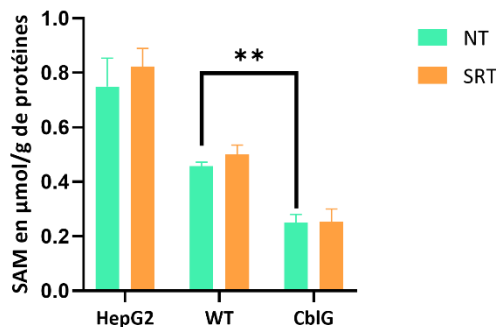


Figure 82 : Effet de l'activation pharmacologique de SIRT1 sur la synthèse de SAM.

L'effet de l'activation pharmacologique de SIRT1 par le SRT2104 sur la synthèse de SAM a été évalué par analyse LC/MS-MS avant et après traitement des cellules HepG2, des fibroblastes contrôles (WT) et de patients CblG au SRT2104 à 1 μ M pendant 72 h. NT = non-traités. Moyenne \pm écart-type, $n=3$, $N=3$, ** = $p < 0,01$; Two-way ANOVA avec correction Tukey, GraphPad.

L'activation pharmacologique de SIRT1 ne semble pas influencer la synthèse de SAM que ce soit dans les cellules HepG2, dans les fibroblastes contrôles ou de patients CblG. Malgré cette observation nous avons poursuivi l'étude du traitement au SRT2104 pendant 72 h afin d'analyser l'impact du traitement sur les interactions protéine-protéine.

V. Effets de l'activation pharmacologique de SIRT1 sur les interactions protéine-protéine

A. Effets sur les interactions protéine-protéine visualisées par co-immunoprécipitation et western blot

Afin d'évaluer les effets de l'activation pharmacologique de SIRT1 sur les interactions protéine-protéines, les cellules HepG2, les fibroblastes contrôles et CblG ont été traités avec 1 μ M de SRT2104 pendant 72 h, puis les protéines totales ont été extraites et quantifiées. Des co-immunoprécipitations ont ensuite été réalisées sur les différentes protéines d'intérêt à savoir SIRT1 et MAT α 2. Par la suite une série de western blot a été réalisée afin d'identifier les potentielles interactions protéine-protéine. Toutes les co-immunoprécipitations et western blots associés ont été réalisés en triplicats techniques et biologiques sauf pour les cellules CblG en raison de leur temps de croissance très lent pour lesquelles 2 réplicas ont été réalisés. Les

résultats ne montrent pas de différence significative car les moyennes de chaque bande de western blot ont été réalisées avec 3 répliques techniques différents. Pour chaque expérience de co-immunoprécipitation d'une protéine d'intérêt, le western blot contre cette même protéine a été réalisé afin de confirmer l'immunoprécipitation. Les normalisations des densités des bandes ont été réalisées uniquement sur les HepG2 et les fibroblastes contrôles et correspondent au ratio de la densité de la bande immunoprécipitée sur la bande de l'input associé.

Dans un premier temps, nous avons étudié l'interaction entre la sous-unité régulatrice MAT α 2 et la sous-unité régulatrice MAT β . Nous avons immunoprécipité MAT α 2 et réalisé un western blot contre cette même protéine avec un autre anticorps afin de valider l'immunoprécipitation. Nous avons ensuite réalisé un western blot contre MAT β . Dans les cellules HepG2 et dans les fibroblastes contrôles nous avons observé une diminution de l'interaction entre MAT α 2 et MAT β dans les cellules traitées comparées aux cellules non-traitées. Dans les fibroblastes CblG, nous avons une augmentation de l'interaction entre ces deux protéines de manière inexplicable après le traitement au SRT2104 (Figure 83). Par la suite, nous avons étudié l'interaction protéine-protéine entre MAT α 2 et SIRT1. Sur les échantillons immunoprécipités pour MAT α 2 nous avons réalisé un Western blot contre SIRT1. Nous n'avons pas mis en évidence d'interaction entre ces deux protéines après avoir réalisé une immunoprécipitation de MAT α 2 suivie d'un western blot de SIRT1 (Figure 83).

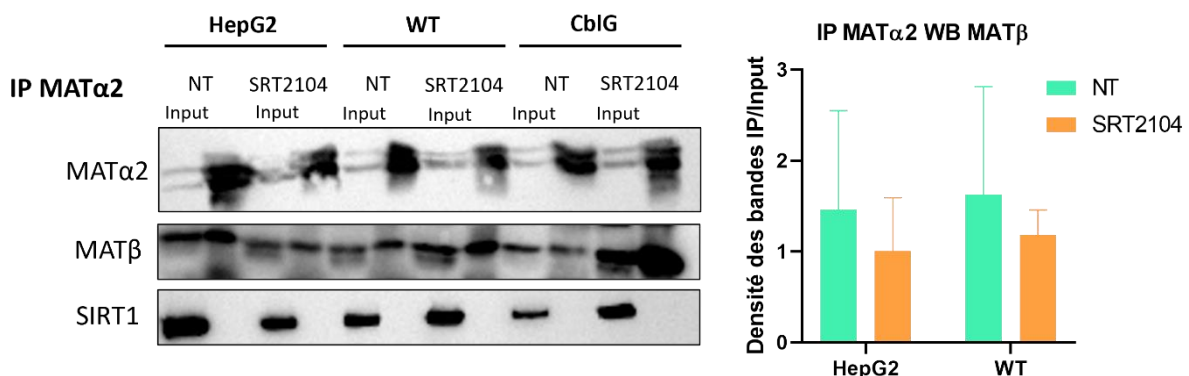


Figure 83 : Co-immunoprécipitation de MAT α 2 et analyse des potentielles interactions avec MAT β et SIRT1.

Des extraits protéiques totaux de cellules HepG2, de fibroblastes contrôles (WT) et de fibroblastes de patients CblG non-traités et traités au SRT2104 à 1 μ M pendant 72 h ont été co-immunoprécipités avec un anticorps contre la MAT α 2 et des western blots contre MAT α 2 avec un autre anticorps ainsi que contre MAT β et SIRT1 ont été réalisés. Le graphique représente la densité normalisée de chaque bande après 3 expériences différentes, moyenne \pm écart-type, NT = non-traité, N=3, Two-way ANOVA avec correction Tukey, GraphPad.

Par la suite, nous avons investigué l'interaction entre SIRT1 et MAT α 2 et entre SIRT1 et MAT β . Nous avons immunoprécipité SIRT1 et réalisé un western blot contre cette même protéine afin de valider l'immunoprécipitation. Nous avons ensuite réalisé un western blot contre MAT α 2 et MAT β . Nous avons comme précédemment réalisé 3 expériences indépendantes et nous n'avons détecté MAT β sur la membrane qu'une seule fois. Dans cette expérience, nous avons observé une légère diminution de l'interaction entre SIRT1 et MAT β dans les HepG2 et

dans les fibroblastes contrôles après traitement au SRT2104. Cependant, dans les fibroblastes CbIG traités au SRT2104, nous avons observé une augmentation de l'interaction entre ces deux protéines. Aucune analyse statistique n'a pu être réalisée car nous avons observé ce résultat uniquement une fois (*Figure 84*). Concernant l'étude de la potentielle interaction entre MAT α 2 et SIRT1, nous avons réalisé la co-immunoprécipitation dans l'autre sens en immunoprécipitant SIRT1 et en réalisant un Western blot contre MAT α 2. Nous avons, cette fois-ci, mis en évidence une interaction entre ces deux protéines. Dans les cellules HepG2, nous n'avons pas montré de différence significative de cette interaction avant traitement comparé à après traitement. Dans les fibroblastes contrôles et de patients CbIG, nous avons observé une légère augmentation de l'interaction après traitement au SRT2104 (*Figure 84*).

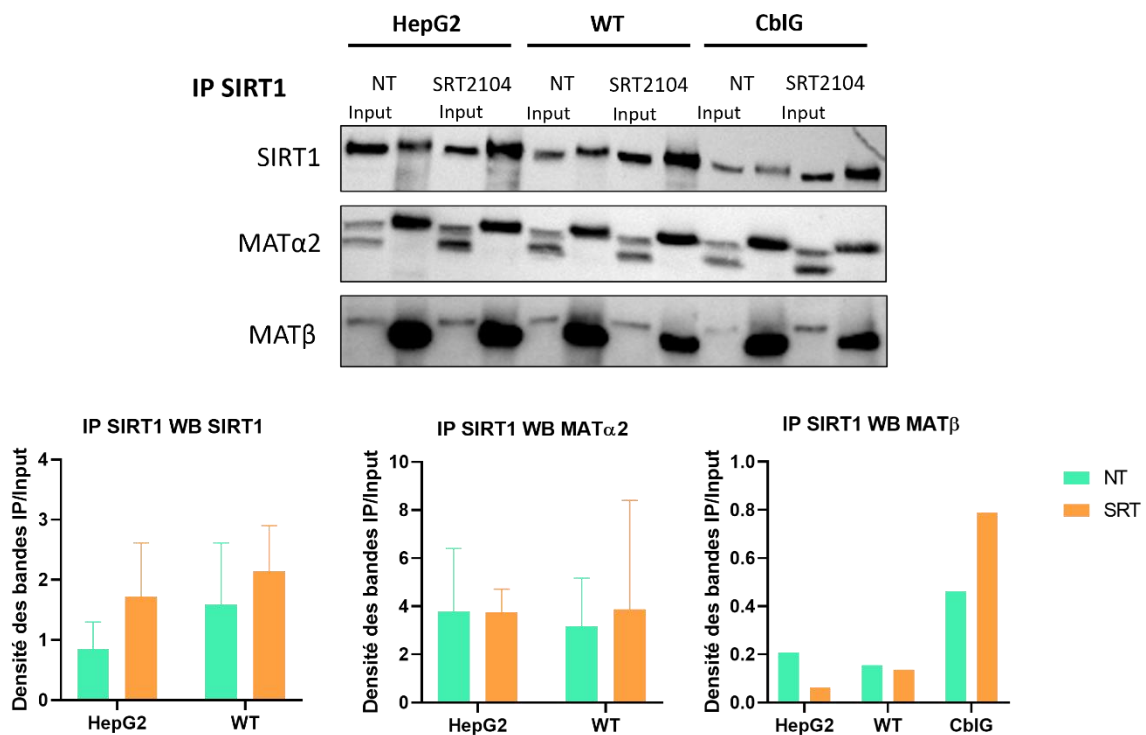


Figure 84 : Co-immunoprécipitation de SIRT1 et analyse des potentielles interactions avec MAT β et MAT α 2.

Des extraits protéiques totaux de cellules HepG2, de fibroblastes contrôles (WT) et de fibroblastes de patients CbIG non-traités et traités au SRT2104 à 1 μ M pendant 72 h ont été co-immunoprécipités avec un anticorps contre SIRT1 et des western blots contre SIRT1 ainsi que contre MAT β et MAT α 2 ont été réalisés. Le graphique représente la densité normalisée de chaque bande après 3 expériences différentes, moyenne \pm écart-type, NT = non-traité, N=3, Two-way ANOVA avec correction Tukey, GraphPad.

B. Interactions protéine-protéine visualisées par Duolink[®] Proximity Ligation Assay

Afin de confirmer les interactions protéine-protéine détectées par co-immunoprécipitation et western blot, nous avons réalisé des Duolink[®] Proximity Ligation Assay. Comme décrit précédemment, les cellules ont été traitées avec 1 μ M de SRT2104 pendant 72 h. Cette expérience a été réalisée une seule fois et l'analyse statistique a été réalisée via les répliques techniques avec 10 images par interaction et par cellule avec approximativement 2 cellules

par images. Nous avons pu quantifier les interactions protéine-protéine par comptage du nombre de spots rouges indiquant une interaction.

Dans un premier temps, nous avons visualisé l'interaction entre MAT β et MAT α 2 dans les fibroblastes contrôles et CblG. Nous avons observé dans les fibroblastes contrôles une diminution de l'interaction entre ces deux protéines après traitement au SRT2104 comparé aux cellules non-traités. Dans les fibroblastes CblG, nous avons observé une augmentation inexplicée de l'interaction entre MAT β et MAT α 2 après traitement. Les résultats sont cohérents avec ceux obtenus par co-immunoprécipitation et western blot. Les augmentations et diminutions observées ne peuvent pas être analysées statistiquement et 2 répliques techniques supplémentaires seront nécessaires pour obtenir des données statistiques (*Figure 85*).

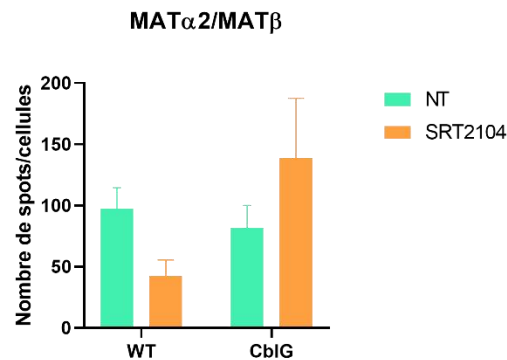
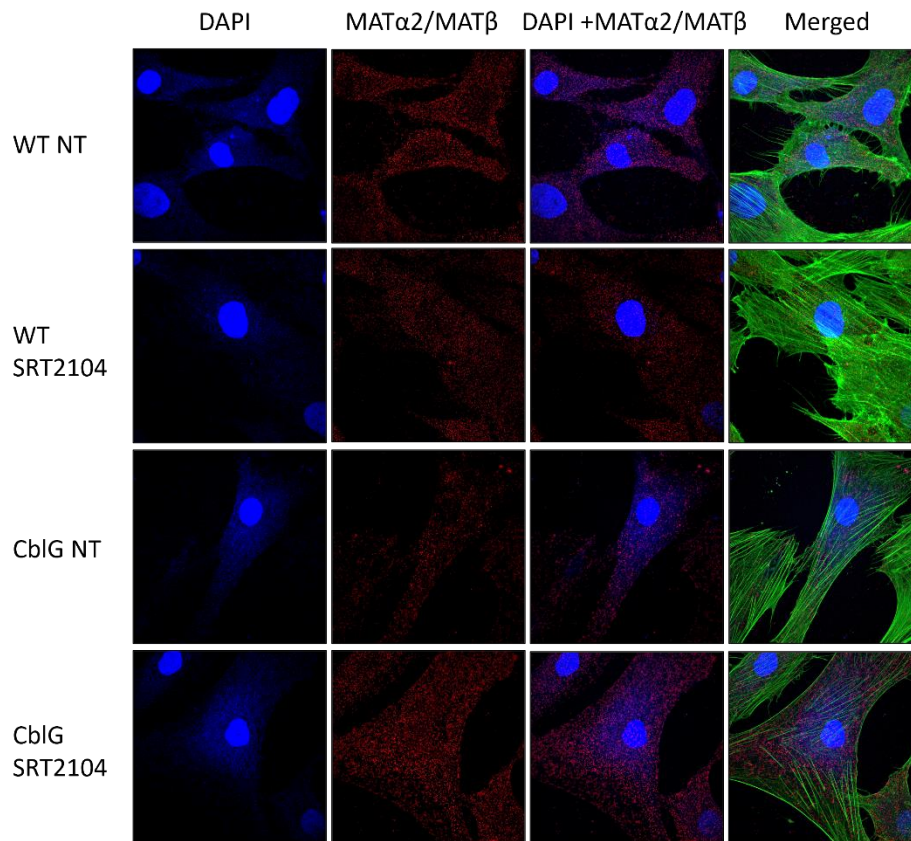


Figure 85 : Confirmation de l'interaction entre MAT β et MAT α 2.

Un Duolink® Proximity Ligation Assay a été réalisé sur des fibroblastes contrôles (WT) et CblG non-traités et traités avec 1 μ M de SRT2104 pendant 72 h. Les points rouges indiquent les interactions protéine-protéine entre la MAT β et MAT α 2. Le graphique représente la quantification du nombre de spots rouges de chaque cellule réalisé grâce au logiciel BlobFinder. Les résultats sont représentés sous la forme de moyenne \pm SEM, n=10 ; Two-way ANOVA ; GraphPad.

Par la suite, nous avons étudié l'interaction entre SIRT1 et MAT β dans les fibroblastes contrôles et CblG. Cette interaction est diminuée dans les fibroblastes CblG non-traités comparés aux WT non-traités. Nous avons mis en évidence une augmentation de l'interaction dans les fibroblastes contrôles après traitement. Cependant, dans les fibroblastes CblG nous n'avons pas noté de différence du nombre de spots avant et après traitement au SRT2104. Malgré ces observations, sachant que l'expérience n'a été réalisée qu'en un seul réplica technique, aucune différence statistiquement significative n'a pu être calculée (Figure 86).

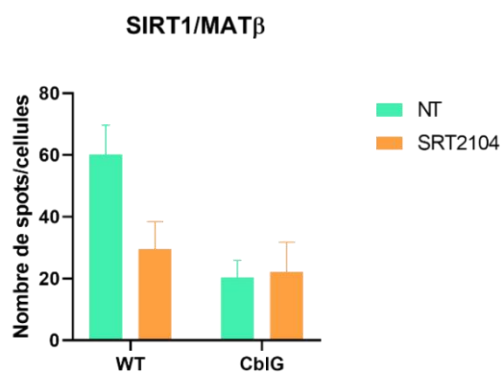
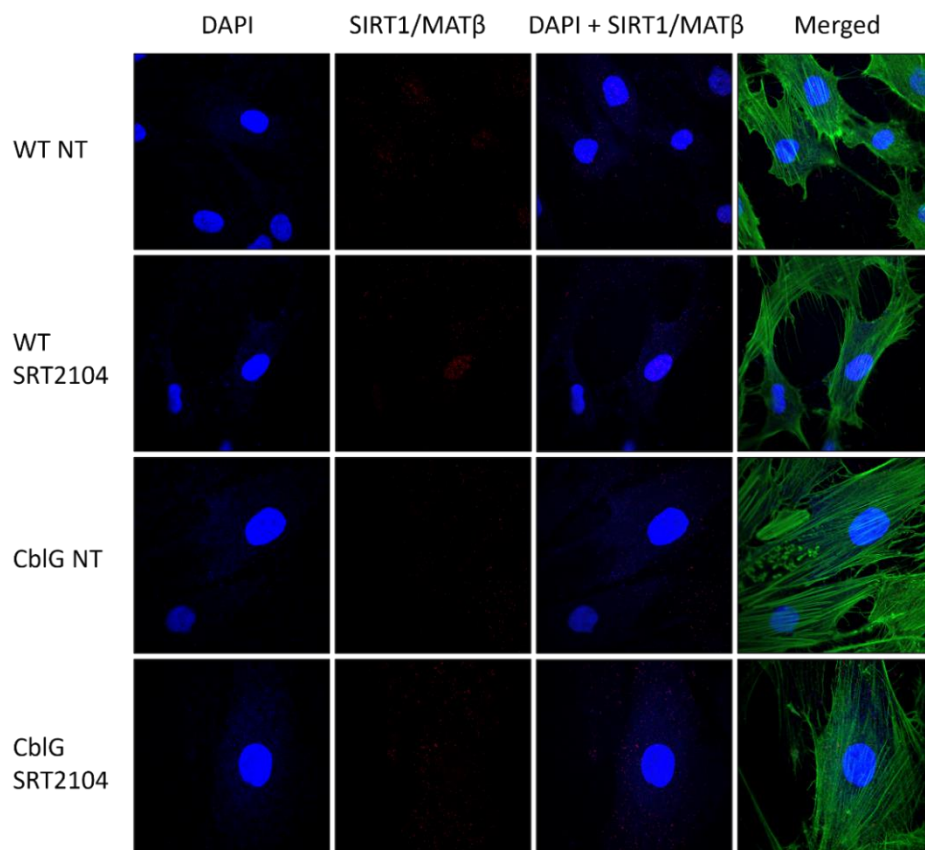


Figure 86 : Confirmation de l'interaction entre MAT β et SIRT1.

Un Duolink® Proximity Ligation Assay a été réalisé sur des fibroblastes contrôles et CbIG non-traités et traités avec 1 μ M de SRT2104 pendant 72 h. Les points rouges indiquent les interactions protéine-protéine entre MAT β et SIRT1. Le graphique représente la quantification du nombre de spots rouges de chaque cellule réalisé grâce au logiciel BlobFinder. Les résultats sont représentés sous la forme de moyenne \pm SEM, n=10 ; Two-way ANOVA ; GraphPad.

Enfin, concernant l'étude de l'interaction entre MAT α 2 et SIRT1, nous avons confirmé cette interaction par Duolink® Proximity Ligation Assay dans les fibroblastes contrôles et CbIG. Nous avons mis en évidence une augmentation de cette interaction après traitement au SRT2104 comparé aux cellules non-traités (WT et CbIG). Ces résultats sont cohérents avec ce qui a été observé en co-immunoprécipitation et western blot. Cependant, cette augmentation n'est pas statistiquement significative (*Figure 87*).

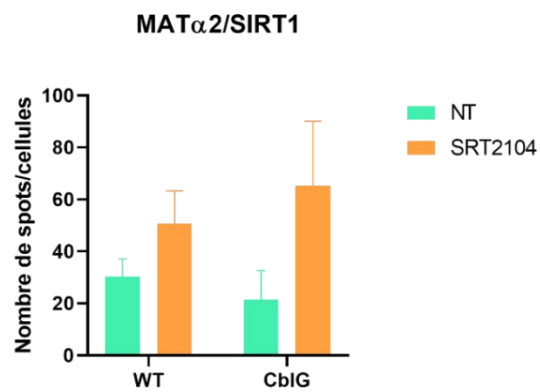
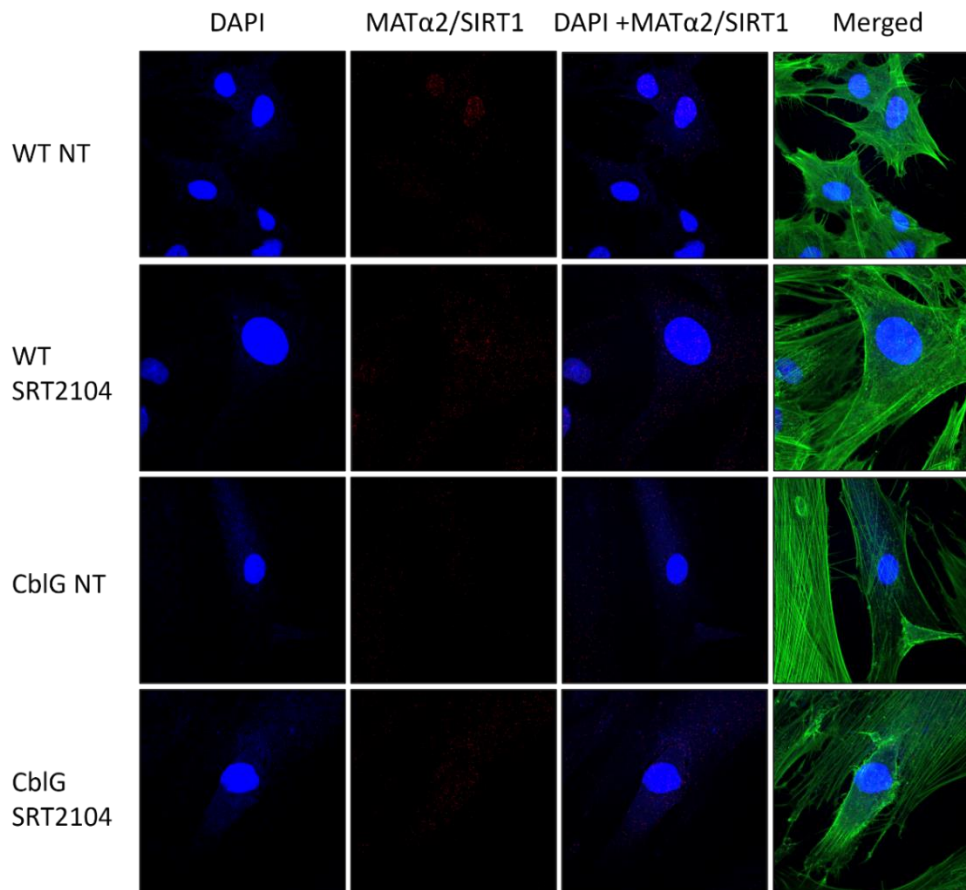


Figure 87 : Confirmation de l'interaction entre MAT α 2 et SIRT1.

Un Duolink® Proximity Ligation Assay a été réalisé sur des fibroblastes contrôles (WT) et CbIG non-traités et traités avec 1 μ M de SRT2104 pendant 72 h. Les points rouges indiquent les interactions protéine-protéine entre MAT α 2 et SIRT1. Le graphique représente la quantification du nombre de spots rouges de chaque cellule réalisé grâce au logiciel BlobFinder. Les résultats sont représentés sous la forme de moyenne \pm SEM, n=10 ; Two-way ANOVA ; GraphPad.

Le traitement que nous avons utilisé ne semble donc pas induire d'augmentation de la synthèse de SAM et ne modifie pas significativement les interactions entre les différents partenaires étudiés. Cependant, nous avons mis en évidence une nouvelle interaction entre SIRT1 et MAT α 2 qui nécessitera de plus amples investigations afin de comprendre son rôle physiologique. Il semblerait donc que le SRT2104 à 1 μ M pendant 72 h ne présente pas d'effet sur les différents paramètres étudiés.

Discussion

La régulation de l'expression des gènes implique des modifications épigénétiques qui ont lieu dans le noyau ou dans la mitochondrie pour les gènes mitochondriaux. Ces modifications épigénétiques sont des changements héréditaires dans l'activité ou dans la fonction des gènes qui ne sont pas associés à une modification de la séquence nucléotidique (Moore, Le, et Fan 2013b). L'un des processus épigénétiques les plus étudiés est la méthylation correspondant au transfert d'un groupement méthyle d'une molécule donneuse à une molécule réceptrice via une méthyltransférase. Cette régulation de l'expression des gènes dépend de la compartimentation spatiale des enzymes impliquées dans les voies de méthylation pouvant interagir et stimuler les activités enzymatiques en permettant une proximité entre producteur et consommateur des métabolites associés (Zecchin et al. 2015b).

Il est connu que des défauts génétiques du métabolisme de la vitamine B12 sont associés à une accumulation d'homocystéine et une diminution de la synthèse de méthionine et de SAM. Cependant, la méthionine nécessaire à la synthèse de SAM ne provient pas uniquement de la reméthylation de l'homocystéine par la MS mais aussi de l'alimentation et du catabolisme des protéines. Or, des études antérieures du laboratoire ont montré une diminution de la synthèse de SAM malgré la présence de méthionine dans l'alimentation des animaux ou dans le milieu de culture des cellules suggérant donc que la méthionine produite *de novo* est un processus important dans la synthèse de SAM (J.-L. Guéant et al. 2022c). En effet, il est connu que les défauts génétiques héréditaires impactant le gène *MTR* codant pour la méthionine synthase ou des défauts impactant les autres protéines induisant une diminution de l'activité de la MS sont associées à des défauts de la reméthylation de l'homocystéine et à une diminution de la synthèse de SAM (Martina Huemer et al. 2017b). De plus, il a été montré une absence de modification de la méthylation globale de l'ADN dans le tissu cérébral et oculaire des souris transgéniques déficientes en MS malgré la diminution globale des concentrations en SAM (Matmat et al. 2024). Ces observations posent donc la question de l'existence de différents « pool » de méthionine cellulaire pouvant être préférentiellement utilisés dans la production de SAM (Robinson et al. 2016; Bauchart-Thevret et al. 2009).

Depuis quelques années, il a été montré qu'une douzaine de méthyltransférases présentent des variations de localisation en fonction des besoins cellulaires. En effet, il a été décrit que les MATs ou encore la SAHH pouvaient être retrouvées au niveau nucléaire, ce qui suggère la nécessité d'avoir un « pool » d'enzymes localisées dans le compartiment nucléaire pour répondre aux besoins de la cellule de réaliser des réactions de méthylations impliquées notamment dans les mécanismes épigénomiques (Pérez-Miguelsanz et al. 2017b).

L'objectif principal de ce projet de thèse de doctorat était de comprendre pourquoi la régulation épigénomique de l'expression des gènes dépend de l'activité de la méthionine synthase en étudiant l'interactome de la MS et la compartimentation de la synthèse de méthionine. Ce projet a été divisé en 4 parties afin 1) d'étudier les localisations subcellulaires des enzymes et métabolites en jeu, 2) l'activité enzymatique de la MS dans les différents compartiments, 3) d'identifier de nouvelles interactions protéines-protéines et 4) d'étudier

les effets de l'activation pharmacologique de SIRT1 sur la synthèse de SAM et la modulation d'interactions protéiques.

Dans ce travail nous avons montré que la méthionine synthase, habituellement décrite comme strictement cytosolique est aussi localisée dans le noyau des cellules humaines où elle interagit avec MAT α 2, la sous-unité catalytique de l'enzyme MAT II synthétisant la SAM, et la méthyltransférase DNMT3b qui utilise la SAM pour méthyler *de novo* l'ADN. De plus, nous avons détecté toutes les enzymes et tous les métabolites associés du cycle de la méthionine dans le compartiment nucléaire, incluant MTHFR et son produit catalytique, le 5-meTHF, cosubstrat de la MS. Enfin, nous avons proposé que le cycle de la méthionine nucléaire et les interactions protéine-protéine identifiées pourraient contribuer aux réactions de transméthylation impliquées dans la régulation de l'expression des gènes en produisant localement les métabolites nécessaires à la synthèse de SAM. Pour finir, nous avons mis en évidence que l'activation pharmacologique de SIRT1 à 1 μ M pendant 72h ne module pas les interactions protéine-protéine impliquant les MATs, SIRT1 et HuR ainsi que sur la synthèse de SAM.

I. Localisation subcellulaire de la MS et des enzymes du cycle de la méthionine

Depuis quelques années, le nombre d'enzymes métaboliques présentes dans le noyau ne cesse d'augmenter, faisant du noyau un organite où se déroulent de nombreuses activités métaboliques. Il est donc probable que ces enzymes métaboliques localisées dans le noyau produisent des métabolites à une échelle beaucoup plus petite à l'intérieur du noyau et influencent les autres enzymes dépendantes de ces métabolites à proximité. Une autre possibilité est que la localisation nucléaire de ces enzymes métaboliques soit très transitoire et modifie à peine l'abondance en métabolites dans le noyau de manière temporaire pour répondre aux besoins cellulaires à un instant t. Il est aussi possible que ces enzymes forment des complexes avec des facteurs de transcription spécifiques et participent directement à la régulation de l'expression des gènes (Z. Zhao, Wang, et Di 2016). Ce processus a par exemple été mis en évidence avec MAT α 2 qui interagit avec le facteur de transcription Mafk pour réguler l'expression de gènes cibles par méthylation de ce dernier via la SAM (Kato et al. 2011a).

La compartimentation subcellulaire du métabolisme des folates est un processus bien référencé dans la littérature où de nombreuses études ont décrit un réseau complexe de voies de signalisation interconnectées et localisées entre la mitochondrie, le cytoplasme et le noyau. Lors d'une carence en folate ou une déficience génétique, les niveaux nucléaires en folates restent hauts grâce à la translocation nucléaire de MTHFD1 qui produit le méthylène tétrahydrofolate à partir de formate (Field et al. 2014). De manière similaire, la glycine N-méthyltransférase (GNMT) est une enzyme cytosolique qui peut aussi être importée vers le noyau durant la déficience en folate (Y.-C. Wang et al. 2014). Des études précédentes ont démontré que de nombreuses enzymes impliquées dans le cycle de la méthionine pouvaient

être retrouvées dans le noyau. En effet, les réactions de transméthylation produisent de la SAH, un inhibiteur de méthyltransférases.

La présence de la SAHH, la seule enzyme capable d'hydrolyser la SAH en homocystéine et adénosine, est nécessaire dans tous les compartiments subcellulaires où les réactions de transméthylation ont lieu. La SAHH est une enzyme hautement conservée dont les fonctions sont essentielles pour le développement embryonnaire. Il a été montré que l'absence de cette enzyme induisait une mort *in utero* (Miller et al. 1994). La SAHH est retrouvée chez les procaryotes et chez les eucaryotes et est distribuée de manière ubiquitaire dans tous les tissus des animaux. Elle est retrouvée en plus forte concentration dans les organes à forte activité métabolique comme le foie, le pancréas ou le rein. Puisque cette protéine est dépendante des réactions de transméthylation, elle est donc retrouvée aussi bien dans le cytoplasme que dans le noyau (Kloor et al. 2007). Il a par exemple été montré que la SAHH était présente en de très fortes concentrations dans le noyau des cellules de *Xenopus laevis* durant l'embryogénèse au niveau des cellules transcriptionnellement actives (Radomski, Kaufmann, et Dreyer 1999). Cette présence nucléaire coïncide avec de fort taux de synthèse des ARNm, ce qui peut refléter la nécessité d'hydrolyser la SAH pour maintenir la méthylation de la coiffe des ARNm durant l'embryogénèse (Grbeša et al. 2017).

De plus, la CBS, l'enzyme convertissant l'homocystéine en cystathionine, peut aussi être présente dans le noyau. Il est possible que la SUMOylation régule l'activité de la CBS, sa localisation dans le noyau ou encore induise un rôle inconnu de la protéine dans ce compartiment (Kabil, Zhou, et Banerjee 2006).

Enfin, il est bien connu dans la littérature que les enzymes MATs sont elles aussi localisées dans le compartiment nucléaire en plus du compartiment cytoplasmique. En effet, MAT α 1 a été retrouvée en faible proportion dans le noyau des cellules CHO de façon concomitante avec une augmentation de la triméthylation de H3K27 (Reytor et al. 2009b). Chez la drosophile, il a été montré que MAT α 2 était présente dans le noyau où elle a une fonction de "silencing" des gènes (Larsson, Zhang, et Rasmuson-Lestander 1996b). Chez les mammifères, MAT II a aussi été retrouvée dans le noyau interagissant avec des facteurs de transcription (Katoh et al. 2011a; Kera et al. 2013d). Toutes ces données suggèrent que les réactions de transméthylation qui se déroulent dans le noyau nécessitent la présence d'enzymes du cycle de la méthionine pour réaliser un contrôle dynamique des besoins en SAM.

Dans notre étude nous avons confirmé les localisations nucléaires connues de la SAHH, de la CBS et des MATs mais nous avons aussi mis en évidence la localisation nucléaire de la MS, de la MSR ainsi que de MTHFR ce qui supporte l'idée d'un cycle de la méthionine nucléaire. La production nucléaire de groupement méthyle avait été suggérée par des données antérieures où avait été décrit une localisation nucléaire des autres enzymes du cycle des folates à savoir DHFR, SHMT1, SHMT2a et TYMS (Field et al. 2018b). Afin d'essayer d'expliquer cette localisation nucléaire de la MS nous avons analysé la séquence du gène *MTR* en utilisant différents logiciels de prédiction et nous n'avons pas trouvé de signal d'import nucléaire (NLS :

nuclear localization signal). Habituellement, les protéines possédant un poids moléculaire supérieur à 40 kDa nécessitent un NLS pour être transloquées vers le noyau (Cautain et al. 2015). Cependant, il a été montré que la translocation de la BHMT, MTHFD1 et GNMT se produisait en l'absence de séquence consensus de localisation nucléaire. Malgré cela, il a été montré que la BHMT présente des résidus basiques dans sa partie N-terminale pouvant être méthylés ou acétylés de manière post-traductionnelle induisant ou non la rétention cytoplasmique de l'enzyme (Pérez-Miguelsanz et al. 2017b).

Nous avons ensuite étudié l'influence de l'état prolifératif des cellules sur la localisation nucléaire de la MS. En effet, nous avons réalisé un co-marquage de la MS avec de l'EdU afin de mettre en évidence les cellules en phase exponentielle de prolifération. Cette expérience n'a pas montré de différence de localisation de la MS en fonction de l'état prolifératif (Y.-C. Wang et al. 2014). Nous nous sommes ensuite intéressés à des modifications post-traductionnelles connues pour être des marqueurs du transport du cytoplasme vers le noyau : la O-N-acétylglucosamination et la SUMOylation (Ma et Hart 2014). Nos résultats ont montré que ces modifications post-traductionnelles n'étaient pas spécifiquement associées à la localisation nucléaire de la MS.

II. Activité enzymatique nucléaire de la MS

Nos observations ont mis en évidence la présence de tous les métabolites intermédiaires du cycle de la méthionine dans le noyau comme ils sont décrits dans le cytoplasme, à savoir la méthionine, la SAM, la SAH, l'homocystéine, le 5-meTHF et la cystathionine. Ces résultats suggèrent une localisation nucléaire des différentes enzymes du cycle ou un transport de ces métabolites du cytoplasme vers le noyau. La membrane nucléaire, contrairement à la membrane mitochondriale, est une barrière hautement perméable aux petites molécules incluant les métabolites nécessaires aux enzymes réalisant des modifications épigénétiques comme l'acétyl-CoA, le NAD⁺, le NADH, le FAD, la SAM ou encore l' α -cétoglutarate (Zecchin et al. 2015b). Bien que le NAD⁺ puisse être transporté vers d'autres compartiments subcellulaires, il semble plausible que ces compartiments disposent également d'une biosynthèse autonome du NAD⁺, surtout si l'on considère les taux élevés de consommation de NAD⁺ que nécessitent une réplétion compensatoire. En effet, dans le noyau et les mitochondries, qui nécessitent tous deux une réplétion de NAD⁺ en raison de la consommation médiée par les sirtuines, ces compartiments sont capables de resynthétiser du NAD⁺ à partir de NAM (Houtkooper et al. 2010b). On observe le même style de mécanisme pour l'acétyl-CoA qui est capable de traverser facilement les membranes. Là aussi on retrouve des enzymes impliquées dans son métabolisme dans le compartiment nucléaire permettant une production fine et régulée d'acétyl-CoA nécessaire à l'acétylation des histones (Pyruvate déshydrogénase : PDH) ou encore au recyclage des produits des réactions médiées par les histones déacétylases (acétyl-CoA synthétase : ACS2) (Bulusu et al. 2017b; Wellen et al. 2009). De plus, comme mentionné précédemment, certaines enzymes du cycle des folates et du cycle de la méthionine, ont été retrouvées au niveau nucléaire. En se basant sur ces

données et sur le fait que certains métabolismes comme celui du NAD⁺ ou celui de l'acétyl-CoA présentent une production de métabolites par des enzymes localisées dans le compartiment nucléaire, nous avons émis l'hypothèse de l'existence d'un cycle de la méthionine dans le noyau.

Dans ce travail, nous avons mis en évidence la présence de méthionine dans le compartiment nucléaire. De plus, nous avons comparé ces niveaux entre des fibroblastes contrôles et des fibroblastes CblG déficients en méthionine synthase. Malgré une forte diminution de l'expression de la MS dans le cytoplasme des cellules CblG, nous avons paradoxalement observé dans le compartiment nucléaire des niveaux d'expression similaires de la MS ainsi que des métabolites associés comme la méthionine et la SAM entre les contrôles et les CblG. Ces résultats suggèrent que la compartimentation nucléaire du cycle de la méthionine pourrait être un mécanisme de régulation pour protéger la machinerie nucléaire des conséquences de la perte d'activité de la MS dans le cytoplasme des cellules CblG. La présence de la MS au niveau nucléaire ainsi que celle de tous les métabolites intermédiaires du cycle de la méthionine suggèrent l'existence d'une activité enzymatique nucléaire de la MS pour produire la méthionine directement dans le noyau. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons mis en place 2 types d'incorporation *in vitro* et *in cellulo* de métabolites marqués par des isotopes stables (homocystéine deutérée ou Hcy-D4) ou radioactifs (5-[¹⁴C]me-THF). Cette étude nous a permis de mettre en évidence dans les fractions nucléaires des cellules HepG2 et des fibroblastes contrôles la production de méthionine marquée résultante d'une activité enzymatique nucléaire de la MS. Ces résultats constituent la première preuve expérimentale d'une activité enzymatique nucléaire de la MS. Dans nos expériences d'incorporation d'homocystéine deutérée, nous avons essayé de mesurer la SAM-D4 produite à partir de méthionine-D4 synthétisée *de novo* par la MS. Cependant nous n'avons pas pu détecter de valeurs suffisamment élevées de SAM-D4 par analyse LC/MS-MS, témoignant potentiellement d'un rétrocontrôle négatif dû à la production de SAH à partir d'homocystéine inhibant les MATs ou à la compétition entre la méthionine synthétisée *de novo* et la méthionine exogène.

III. Les interactions protéine-protéine impliquant la MS

Enfin, nous avons investigué *in silico* les potentielles interactions protéine-protéine entre la MS et d'autres protéines en utilisant les bases de données de prédictions d'interactions (FpClass, BioGRID, BioPlex ...). Ces bases de prédictions nous ont permis d'identifier 59 protéines pouvant interagir avec la MS dont 33 protéines exclusivement nucléaires incluant la méthyltransférase NSUN5P1 et la protéine RCCD1 impliquée dans la réorganisation de la chromatine et la régulation de la méthylation H3K26. Ces données sont donc cohérentes avec nos résultats démontrant la localisation nucléaire de la MS.

Notre hypothèse d'une utilisation préférentielle de la méthionine produite *de novo* pour la synthèse de SAM suggère une interaction entre la MS et les enzymes MATs. Les voies métaboliques sont connues pour être des processus hautement régulés par la formation de complexes multiprotéiques. Dans le contexte de la MS, des interactions protéine-protéine ont

été rapportées dans la littérature. En effet, il est connu que la MS interagit dans le cytoplasme avec la MSR afin de réduire la cob(III)alamine et ainsi de réactiver la MS (J. Zhang et al. 2020b). De plus, il a été montré par le laboratoire que la MS interagit avec la protéine MMACHC responsable du transport cytoplasmique de la vitamine B12. Le laboratoire a aussi mis en évidence il y a quelques années un interactome cytoplasmique de la MS en décrivant un complexe multiprotéique entre la MS, MSR, MMACHC et MMADHC (Bassila et al. 2017b).

Les MATs présentent aussi un grand interactome fonctionnel que ce soit dans le compartiment nucléaire ou dans le cytoplasme. En effet, MAT α 1 est connue pour interagir avec la BHMT, la SAHH et la nicotinamide N-méthyltransférase (NNMT) dans le cytoplasme et avec des facteurs de transcription ou des oncogènes comme PDRG1, cMyc, cMaf dans le noyau. Le partenaire le plus connu de MAT α 2 est la sous-unité régulatrice MAT β avec laquelle elle interagit dans le cytoplasme mais aussi dans le noyau. La sous-unité catalytique de MAT II est aussi connue pour interagir avec de nombreuses méthyltransférases nucléaires comme SETDB1 (Kera et al. 2013d; Katoh et al. 2011a). Dans ce travail nous avons montré que la MS interagit avec MAT α 2 dans le cytoplasme et dans le noyau des cellules HepG2, des fibroblastes contrôles (WT) et de patients CblC, CblG et CblE. Bien que le rôle crucial de la méthylation des histones et de l'ADN dans les processus épigénétiques ait été décrit, la compréhension de l'origine de la SAM au niveau nucléaire reste très peu documentée. Certaines études ont montré que la localisation nucléaire des MATs et les interactions protéine-protéine avec les méthyltransférases contribuent à la régulation de l'expression des gènes en faisant parvenir la SAM localement pour les enzymes nucléaires (Portillo, Vázquez, et Pajares 2020b). A l'heure actuelle, un complexe multiprotéique de répression de la transcription intégrant la SAM nommé SAMIT a été proposé comme complexe incluant les MATs pour produire la SAM localement afin de réprimer la transcription des gènes par méthylation de l'ADN (Kera et al. 2013d; Katoh et al. 2011a; C. Zhao et al. 2018). Ces interactions entre les MATs et les méthyltransférases suggèrent donc que la synthèse de SAM est directement couplée à la méthylation de protéines cibles ou de l'ADN. Sachant que MAT α 2 a été décrite dans le noyau interagissant avec de nombreuses méthyltransférases, nous avons émis l'hypothèse que la MS pouvait aussi interagir avec des méthyltransférases.

L'un des mécanismes de régulation épigénétique contrôlant l'expression des gènes les plus importants est la méthylation directe de l'ADN. Il s'agit d'un facteur épigénétique majeur influençant l'activité des gènes (Moore, Le, et Fan 2013b). Cette modification épigénétique est réalisée par des ADN méthyltransférases permettant le transfert du groupement méthyle en provenance de la SAM sur le 5^{ème} carbone d'un résidu cytosine. Bien que la méthylation soit un processus récurrent sur l'ADN, la 5mC ne représente que 1% des acides nucléiques du génome humain. Les principales marques de méthylation sont retrouvées sur les cytosines précédant une guanine et plus communément connues sous le nom d'îlots CpG retrouvés dans environ 60% des promoteurs. Des études antérieures ont par ailleurs montré une diminution du ratio SAM/SAH ou index de méthylation ainsi que de l'expression du gène *Dnmt3a* suggérant de probables conséquences épigénétiques impliquant la méthylation de l'ADN dans

des cellules de patients CblG ou dans des tissus de souris transgéniques déficientes en MS (Caudill et al. 2001). D'autres études ont mis en évidence une absence de modification de la méthylation globale de l'ADN dans les cellules de patients CblC et CblG (Rashka et al. 2020) ou dans les tissus des souris déficientes en MS dans le cerveau et les yeux (Matmat et al. 2024).

Nous avons étudié dans un premier temps la potentielle interaction entre la MS et DNMT1 dans les cellules HepG2 et dans les fibroblastes contrôles et nous n'avons pas montré d'interaction protéine-protéine entre ces deux protéines. DNMT1 étant une méthyltransférase impliquée dans la méthylation post-réplication, il est possible que lorsque nous avons réalisé nos expériences nous n'étions pas dans les bonnes phases de la vie des cellules pour observer des interactions dans ce processus dynamique. Il pourrait être intéressant de synchroniser nos cellules afin de visualiser ce complexe dynamique. Notre hypothèse étant basée sur l'utilisation préférentielle de la méthionine produite *de novo* dans la synthèse de SAM pour induire des modifications épigénomiques régulant l'expression des gènes, nous avons alors étudié DNMT3b impliquée dans la méthylation double brin non liée à la réplication cellulaire. Ici, nous avons mis en évidence une interaction entre la MS et DNMT3b dans le noyau et dans le cytoplasme des cellules HepG2, des fibroblastes WT et CblG.

Enfin, étant donné que MAT α 2 est aussi localisée dans le noyau et est connue pour interagir avec des méthyltransférases nucléaires, nous avons étudié l'interaction entre MAT α 2 et DNMT3b. Nous avons montré que ces deux protéines interagissent dans les deux compartiments subcellulaires (cytoplasme et noyau) de toutes les lignées cellulaires étudiées. Pour finir, nous avons donc mis en évidence que la MS interagit avec MAT α 2 et avec DNMT3b et que MAT α 2 interagit avec DNMT3b dans le noyau (*Figure 30*). Nous avons également étudié l'impact de la diminution d'expression de la MS sur ce complexe protéique dans une lignée de cellules CblG et nous n'avons pas mis en évidence de déstabilisation de l'interaction entre MAT α 2 et DNMT3b lorsque la MS n'est plus que faiblement exprimée, ce qui est potentiellement en lien avec l'absence de différence significative dans l'expression protéique nucléaire de la MS dans les cellules CblG comparée aux cellules contrôles. Ce complexe multiprotéique nucléaire suggère donc la présence d'une forte proximité entre les producteurs et les consommateurs de métabolites impliqués dans la méthylation mettant en avant son importance dans la régulation de l'expression des gènes. Ces interactions protéine-protéine au niveau nucléaire pourraient donc être impliquées dans un processus dynamique et adaptatif de modifications épigénétiques impliquées dans la régulation de l'expression des gènes.

IV. Effet de l'activation pharmacologique de SIRT1 sur la modulation des interactions protéiques et la synthèse de SAM

Les patients atteints de défauts génétiques du métabolisme de la vitamine B12 présentent des taux diminués en SAM et une diminution de l'expression de la déacétylase SIRT1 (Garcia et al. 2011) ce qui conduit au développement du stress du RE (R. Ghemrawi et al. 2013). En effet, cette diminution d'expression de SIRT1 induit une augmentation de l'acétylation du facteur

de transcription HSP1 ce qui entraîne une diminution de son activité nécessaire à la production de chaperonnes conduisant donc au stress du RE (R. Ghemrawi et al. 2013). Les résultats précédents du laboratoire ont mis en évidence que les dysfonctionnements du métabolisme des monocarbones conduisent à une altération des modifications post-traductionnelles du type phosphorylation et méthylation de protéines liant les ARNm comme HuR, SRSF1 et HnRNPA1. La diminution d'expression de SIRT1 a été expliquée par une altération de la navette nucléo-cytoplasmique de protéines liant les ARNm (RBP) incluant la protéine de réponse au stress HuR et ses ARNm cibles, dont l'ARNm de SIRT1 (Battaglia-Hsu et al. 2018). Ces modifications de méthylation et de phosphorylation de HuR induisent une diminution ou une augmentation des interactions avec certains composants du pore nucléaire comme CRM1 aboutissant à un changement de composition des complexes protéiques du pore et donc à une localisation aberrante de HuR (Battaglia-Hsu et al. 2018). De plus, une autre étude a mis en évidence que le transport nucléocytoplasmique de SIRT1 est lui aussi hautement dépendant de CRM1, car une inhibition de ce composant par la leptomycine B induit un blocage du transport de SIRT1 (Tanno et al. 2007).

Dans ce contexte, le laboratoire se penche depuis quelques années sur l'impact de l'activation de SIRT1 dans le cadre des dysfonctionnements du métabolisme des monocarbones. De précédentes études menées au laboratoire ont montré que l'activation pharmacologique de SIRT1 via le SRT1720 pouvait augmenter l'activité de SIRT1 et réduire le stress du RE *in vitro* et *in vivo* (Rose Ghemrawi et al. 2019). Enfin, des études récentes au laboratoire ont mis en évidence que le traitement au SRT1720 était rapidement toxique *in vitro* à forte concentration bien qu'il soit très efficace *in vitro* et *in vivo*. C'est pourquoi d'autres activateurs de SIRT1 ont été testés *in vitro* et le SRT2104 a été sélectionné pour la suite des études. Ce traitement a été testé *in vitro* sur des fibroblastes de patients CblC et CblG. Cette étude a mis en évidence que les défauts génétiques du métabolisme de la cobalamine affectent le fonctionnement mitochondrial en induisant un stress oxydant mitochondrial, en diminuant le potentiel de membrane mitochondrial et en altérant la fonction respiratoire mitochondriale. Toutes ces altérations sont concomitantes à un changement de la morphologie du réseau mitochondrial. De plus, le SRT2104 est capable dans cette étude de corriger toutes ces dysfonctions mitochondriales (Hassan et al. *Résultats non publiés*).

De plus, une étude de 2013 a mis en évidence des interactions protéine-protéine particulièrement intéressantes dans le contexte du cycle de la méthionine. En effet, il a été mis en évidence des interactions protéine-protéine entre MAT β /SIRT1 et HuR pouvant être modulées et surtout augmentées par un traitement au resvératrol, un activateur naturel de SIRT1 (Yang et al. 2013a). L'augmentation de cette interaction pourrait faciliter la dissociation entre MAT β et MAT α 2 permettant potentiellement d'augmenter la synthèse de SAM.

Dans ce contexte, nous avons souhaité étudier les effets de l'activation pharmacologique de SIRT1 via le SRT2104 sur la synthèse de SAM en nous focalisant particulièrement sur les modulations des interactions protéine-protéine entre SIRT1, HuR, MAT α 2 et MAT β . Nous

avons démontré que l'activation pharmacologique de SIRT1 avec 1 μ M de SRT2104 pendant 72 heures augmente les niveaux protéiques de SIRT1 significativement dans les fibroblastes CblG. Cependant, nous n'avons pas mis en évidence d'augmentation de la synthèse de SAM dans nos trois types cellulaires (cellules HepG2, fibroblastes contrôles et de patients CblG), contrairement à ce qui a pu être observé dans les modèles de souris KO *Mtr* dans le cerveau (Matmat et al. *Résultats non publiés*). De plus, nos investigations sur la modulation des interactions protéine-protéine ont révélé que le SRT2104 à 1 μ M ne modulait pas de manière significative les interactions entre SIRT1 et MAT β , entre MAT β et MAT α 2 et enfin entre MAT α 2 et SIRT1. Enfin, nous avons confirmé les effets du traitement au SRT2104 sur la correction du stress cellulaire en validant les données précédentes du laboratoire sur la relocalisation de HuR dans les cellules CblG après traitement. La synthèse de SAM ainsi que les interactions protéine-protéine ne semblent donc pas être affectées par un traitement avec 1 μ M de SRT2104 pendant 72 heures, suggérant potentiellement que cette concentration n'est pas suffisante pour augmenter la synthèse de SAM. Cependant, nous avons mis en évidence une nouvelle interaction entre MAT α 2 et SIRT1 qui pourrait être impliquée dans la dissociation entre MAT β et MAT α 2 et pourrait donc jouer un rôle important dans la synthèse de SAM par MAT α 2.

Conclusions et perspectives

Pris dans leur ensemble, ces résultats suggèrent que la compartimentation spatiale du cycle de la méthionine est un processus important dans les modifications épigénomiques impliquées dans la régulation de l'expression des gènes. Dans notre étude, nous avons mis en évidence toutes les enzymes du cycle de la méthionine, dont la méthionine synthase ainsi que tous les métabolites associés dans le compartiment nucléaire. De plus, nous avons mesuré une activité enzymatique de la MS dans le noyau. Enfin, nous avons mis en évidence l'existence d'un complexe protéique impliquant la MS, MAT α 2 et DNMT3b dans le cytoplasme mais aussi dans le noyau des cellules HepG2, des fibroblastes contrôles et de patients CblG. Pour finir, nous avons montré qu'une activation pharmacologique au SRT2104 à 1 μ M pendant 72 heures ne permettait pas d'augmenter significativement la synthèse de SAM et ne permettait pas de moduler de manière significative les interactions protéine-protéine entre MAT β , MAT α 2, SIRT1 et Hur.

Localisation subcellulaire de la MS et des enzymes du cycle de la méthionine

Dans cette étude, nous n'avons pas investigué les mécanismes moléculaires responsables de la translocation nucléaire de la MS dans le noyau. L'étude de la translocation nucléaire de la MS reste un aspect du projet qu'il faudra également poursuivre afin d'en comprendre les mécanismes sous-jacents. En effet, des études précédentes du laboratoire ont observé que le complexe nucléopore impliqué dans la navette nucléo-cytoplasmique des protéines est associé avec une rétention cytoplasmique de HuR, une protéine liant les ARNm (RBP) suite à une altération de méthylation et de la phosphorylation de certains de ses constituants dans les cellules CblG (Battaglia-Hsu et al. 2018).

Pour répondre à cette question, des analyses protéomiques sur les fractions subcellulaires seront nécessaires, incluant des études détaillées sur les composants du nucléopore et les modifications post-traductionnelles de ses composants et les potentielles interactions permettant l'entrée de la MS dans le noyau.

L'identification de modifications post-traductionnelles qui seraient spécifiques à la MS nucléaire permettrait également d'avancer dans la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans sa translocation nucléaire. Ensuite des expériences de mutagenèse dirigée des résidus spécifiquement modifiés pourrait être réalisée afin de valider le rôle de ces modifications.

De plus, même si nous n'avons pas montré de différence de localisation subcellulaire de la MS en fonction de l'état prolifératif des cellules, l'hypothèse de la régulation dynamique de la localisation nucléaire de la MS en accord avec les besoins nucléaires devra être testée. Différents paramètres pourraient être étudiés comme les phases du cycle cellulaire, le stress oxydant, le stress du réticulum endoplasmique et l'apport en méthionine exogène.

Activité enzymatique nucléaire de la MS

Dans cette étude, nous avons apporté la première preuve expérimentale d'une activité enzymatique nucléaire de la MS et donc de la production nucléaire de méthionine. Nous avons également montré des interactions protéine-protéine entre producteur et consommateur de SAM. Cependant, nous n'avons pas encore été en mesure de montrer que la méthionine produite *de novo* au niveau nucléaire est directement ou même préférentiellement utilisée pour la synthèse de SAM nucléaire. Une analyse des groupements méthyles présents au niveau de l'ADN pourrait aussi être envisagée en fonction de la nature isotopique de la méthionine présente dans le milieu ou celle de la méthionine synthétisée dans le noyau.

Les interactions protéine-protéine impliquant la MS

Ici, nous avons étudié les interactions entre la MS et les méthyltransférases de l'ADN, mais de plus amples expériences seront requises pour investiguer des interactions entre la MS et les histones méthyltransférases comme SETDB1 déjà connue pour interagir avec MAT α 2.

D'autres expériences seront aussi nécessaires pour caractériser l'interaction entre la MS et DNMT3b et pour investiguer si MAT α 2 est nécessaire à cette interaction.

Il conviendra par la suite d'étudier l'impact de l'absence de MAT α 2 sur l'interaction entre la MS et DNMT3b dans tous les compartiments subcellulaires. L'influence de la MS ou de la MSR sur la stabilité de l'interaction entre MAT α 2 et DNMT3b pourrait également être analysée.

Afin d'étudier plus spécifiquement les aspects biophysiques de ces nouvelles interactions, une collaboration a déjà été initiée avec Xavier Manival et Benoit Bragantini (IMoPA, UMR 7365 CNRS-UL) et Oscar Hernandez Alba (IPHC UMR 7178 CNRS-Université de Strasbourg). Une demande de subvention à l'ANR avait été déposée en 2023 et sera prochainement re-déposée en 2024.

Effet de l'activation pharmacologique de SIRT1 sur la modulation des interactions protéiques et la synthèse de SAM

Pour finir, il conviendra de tester d'autres paramètres du traitement au SRT2104 en commençant par la concentration afin de voir si l'activation de SIRT1 induit vraiment une augmentation de la synthèse de SAM via la modulation de ces interactions. Si notre hypothèse ne se vérifie pas, nous pourrions explorer la possibilité que les résultats obtenus avec le resvératrol dans l'étude de Yang et al en 2013 sont indépendants de l'activation de SIRT1.

Conclusion générale

L'objectif global de ce projet était de comprendre en quoi la régulation épigénomique de l'expression des gènes dépend de l'activité de la méthionine synthase. Bien que nous n'ayons pas encore de preuve que la méthionine produite *de novo* par la MS au niveau nucléaire est préférentiellement utilisée pour la synthèse de SAM, cette étude nous a permis d'avancer dans la compréhension des mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans la physiopathologie des maladies rares du métabolisme intracellulaire de la vitamine B12. De manière plus générale, ce projet a permis de mettre en lumière une toute nouvelle localisation du cycle de la méthionine impliqué dans la synthèse de SAM et par extension dans les processus de méthylation de l'ADN et des histones plus communément appelé mécanismes épigénomiques. Ce projet aura permis une avancée dans la compréhension des processus épigénomiques impliqués dans la régulation de l'expression des gènes et ouvrent de nouvelles perspectives dans la compréhension de l'implication de la synthèse nucléaire de la méthionine et de la SAM dans les réactions de méthylation à l'intérieur du noyau des cellules de tout l'organisme.

Matériels et méthodes

Fiche 1 : Culture cellulaire

Les fibroblastes de patients provenant de l'Université McGill au Canada (D.R. Rosenblatt ; cblG2*), de l'Université de Zurich en Suisse (M.R Baumgartner ; cblG1*) et du CHRU de Nancy (cblC, cblE et fibroblastes WT) ont été mis en culture. Les cellules HepG2 utilisées dans les différentes expériences proviennent de LGC Standards (Teddington, Royaume-Unis). Les différentes lignées cellulaires ont été cultivées dans du Dulbecco's modified Eagle medium high glucose (DMEM) contenant 4500 mg/L de glucose (Sigma Aldrich, ref : D6429) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté par la chaleur (SVF, Sigma Aldrich, ref : P30-3306) 1% d'antibiotique (pénicilline (Sigma Aldrich, ref : P4333) et streptomycine (Sigma Aldrich, ref : P4333)) et 1% de pyruvate (Sigma Aldrich, ref : S8636). Le PBS 1x a été préparé à partir de PBS 10x (Sigma Aldrich, ref : 1408) et d'eau déionisée stérilisée. Les cellules ont été incubées à 37°C dans une atmosphère humide contenant 5% de CO₂. Le milieu de culture a été changé 2 fois par semaine et les cellules ont été récoltées à 70-80% de confluence pour des études ultérieures.

Tableau 1 : Génotype des fibroblastes de patients CblC, CblG* et CblE.

Groupe de complémentation	Gène muté	Mutation	Effets sur la protéine
Contrôle	/	/	/
cblC	<i>MMACHC</i>	c.271dupA c.616C>T	p.R91KfsX14 p.R206W
cblE	<i>MTRR</i>	c.7A>T	p.R3W
cblG1*	<i>MTR</i>	c.381delA c.2876G>A	p.L128AfsX5 p.V892V
cblG2*		c.609-1088G>A	p.A203EfsX13

Fiche 2 : Trypsination des cellules (fibroblastes et HepG2)

- Eliminer le milieu de culture
- Rincer le tapis cellulaire avec du PBS 1x stérile
- Ajouter le volume adéquat de trypsine (*cf tableau 2*)
- Incuber à 37°C sous atmosphère humide avec 5% de CO₂ pendant 7 minutes pour les fibroblastes et pendant 6 minutes pour les HepG2
- Inhiber l'action de la trypsine avec un volume adéquat de SVF ou de milieu de culture (5* le volume de trypsine nécessaire). *Le SVF contient des inhibiteurs naturels de la trypsine qui sont l'α1-antitrypsine et l'α2-macroglobuline.*
- Réaliser une dizaine d'arcs de cercle avec la suspension cellulaire afin de décoller un maximum de cellules du support
- Transférer la suspension cellulaire dans un tube Falcon adapté
- Centrifuger 5 minutes à 200 g à température ambiante
- Eliminer le surnageant
- Resuspendre le culot cellulaire dans un volume adéquat de milieu de culture DMEM, pour le maintien à une dilution au 1/6 pour les fibroblastes de patients et les HepG2 et au 1/13 pour les fibroblastes contrôles, ou pour toutes autres analyses cellulaires après comptage du nombre de cellules.
- Le nombre de cellules dans une suspension cellulaire peut être déterminé soit par comptage manuel à la cellule de Malassez soit par comptage automatisé (Luna, Logos biosystème, ref : LUB-13-00271) au bleu de trypan (Sigma Aldrich, ref : T8154)

Tableau 2 : Récapitulatif des différents volumes de réactifs utilisés en fonction du support de culture cellulaire choisi.

Support de culture	Surface en cm ²	Milieu de culture (mL)	PBS 1x stérile (mL)	Trypsine (mL)	Milieu de culture pour inactivation de la trypsine	SVF pour inactivation de la trypsine
24 puits / 4 puits	1,9	0,5	0,5	0,5	2,5	0,5
6 puits	9,6	3	1,5	0,5	2,5	0,5
T25	25	5	2,5	1	5	1
P100	57	10	5	2	10	2
T75	75	15	7,5	3	15	3
T150	150	25	12,5	6	30	6

Fiche 3 : Congélation et décongélation des cellules

Congélation

- Après trypsination des cellules, reprendre le culot cellulaire dans 400 µL de milieu de culture
- Transférer les 400 µL dans un cryotube de 1 mL
- Ajouter au goutte à goutte un mélange de 600 µL contenant 500 µL de SVF et 100 µL de diméthylsulfoxyde (DMSO, Sigma Aldrich, ref : D8418)
- Placer le cryotube dans une boîte de congélation à isopropanol et placer la boîte à -80°C pendant 24 h minimum
- Transférer le cryotube dans de l'azote liquide

Décongélation

- Déposer 12 mL de milieu de culture dans un tube Falcon de 15 mL
- Décongeler le cryotube par friction entre les mains jusqu'au dernier glaçon
- Décontaminer l'extérieur du tube à l'éthanol 70%
- Transférer le contenu du cryotube dans le tube Falcon contenant les 12 mL de milieu de culture
- Mélanger par retournement doucement
- Centrifuger 5 minutes à 200 g à température ambiante
- Éliminer le surnageant et reprendre le culot cellulaire dans le volume adéquat de milieu de culture en fonction du support de culture choisi (*cf tableau 2*)

Fiche 4 : Fractionnement subcellulaire

La séparation des fractions cytoplasmiques et nucléaires a été réalisée en utilisant le kit NE-PER® (ThermoFisher Scientific, ref : 78833) en accord avec les instructions du fabricant. Cette séparation s'effectue sur culot de cellules fraîchement récoltées et non mises à -20°C pour éviter l'éclatement des cellules.

- Resuspendre le culot de cellules fraîches dans le volume adéquat de tampon CER I et ajouter le volume correspondant de cocktail anti-protéase (1% de PIC, Sigma Aldrich, ref : P8340) (*cf tableau 3*)
- Vortexer et incuber 10 min sur glace
- Ajouter le volume adéquat de tampon CER II (*cf tableau 3*), vortexer et incuber 1 minute sur glace
- Vortexer de nouveau et centrifuger 5 minutes à 16 000 g à 4°C
- Transférer le surnageant dans un nouveau tube annoté (cytoplasme) et le remettre sur glace
- Resuspendre le culot dans un volume adéquat de tampon NER et ajouter le volume correspondant de PIC (*cf tableau 3*)
- Vortexer puis incuber 10 minutes sur glace
- Vortexer toutes les 10 minutes pendant 40 minutes et réincuber sur glace à chaque fois
- Centrifuger 10 minutes à 16 000 g à 4°C
- Transférer le surnageant dans un nouveau tube annoté (noyau) et le remettre sur glace
- Stocker les tubes à -80°C jusqu'au dosage et analyses postérieures

Tableau 3 : Récapitulatif des volumes nécessaires des tampons CER I, CER II, NER ainsi que de cocktail anti-protéase en fonction du nombre de cellules.

Nombre de cellules	Volume cellulaire (µL)	CER I (µL)	PIC (µL)	CER II (µL)	NER (µL)	PIC (µL)
1*10 ⁶	10	100	1	5,5	50	0,5
2*10 ⁶	20	200	2	11	100	1
5*10 ⁶	50	500	5	27,5	250	2,5
10*10 ⁶	100	1000	10	55	500	5

Fiche 5 : Extraction de protéines totales au Lysis Buffer

- Resuspendre le culot cellulaire sec conservé à -80°C dans 250 à 500 µL de tampon de lyse (Lysis Buffer, *cf tableau 4*) en fonction de la taille du culot
- Ajouter 1% de cocktail anti-protéase (PIC, Sigma Aldrich, ref : P8340), 1% de fluorure de phénylméthylsulfonyl (PMSF : inhibiteur de protéases, Sigma Aldrich, ref : P7626), 1% d'orthovanadate (inhibiteur de phosphatases et de kinases, Sigma Aldrich, ref : S6508) et 5% de NaBu (immunoprécipitation et homogénéisation des protéines)
- Vortexer et laisser incuber sur glace pendant 30 minutes
- Vortexer de nouveau et centrifuger 10 minutes à 12 000g à 4°C
- Transférer le surnageant dans un nouveau tube annoter et le conserver à -80°C jusqu'au dosage et analyses postérieures

Tableau 4 : Composition du tampon de lyse.

Réactif	Fournisseur	Référence	Volume (mL)
NaCl 5 M	Sigma Aldrich	59888	1,5
Tris 1M pH 8	Sigma Aldrich	T-6066	1
IGEPAL	Sigma Aldrich	238589	0,5
EDTA 0,5 M pH 8	Sigma Aldrich	E9884	0,1
QSP 50 mL d'eau milliQ et ajustement du pH à 7,4 avec de l'HCl			

Fiche 6 : Dosage protéique à partir de la méthode BCA assay

- Préparer une gamme étalon en triplicata (*cf tableau 5*)

Tableau 5 : Réalisation de la gamme étalon de BSA.

Cf (µg/mL)	BSA (µL)	Tampon d'extraction protéique (µL)
0	0	25
96	1,2	23,8
200	2,5	22,5
400	5	20
800	10	15
1200	15	10
1600	20	5
2000	25	0

- Réaliser une dilution au 1/5 ou au 1/10 des échantillons dans leurs tampons d'extraction protéique (CER I et CER II pour les fractions cytoplasmiques, NER pour les fractions nucléaires et lysis buffer pour les protéines totales)
- Déposer 25 µL de chaque point de gamme ou 25 µL d'échantillon dilué en triplicata dans une plaque 96 puits
- Préparer le réactif de travail en mélangeant 50 volumes du réactif A (BCA) avec 1 volume de réactif B (CuSO₄) (Interchim, ref : UP40840A)

V de réactif de travail

*= (nombre de tube de gamme * nombre de réplicats)*

*+ (nombre d'échantillons * nombre de réplicats) * volume de mix BCA*

- Répartir 200 µL de réactif de travail dans chaque puits de la laque
- Couvrir la plaque et laisser incuber à 37°C pendant 30 minutes
- Mesurer l'absorbance à 570 nm sur un spectrophotomètre

Fiche 7 : Co-immunoprécipitation

Afin de réaliser l'immunoprécipitation, 3 types de tubes annotés ont été préparés : des tubes Inputs correspondant aux protéines totales présentes dans l'échantillon, des tubes IP correspondant aux échantillons qui subiront l'immunoprécipitation de la protéine d'intérêt et des tubes témoins sans anticorps traités de manière identique aux tubes IP mais n'étant pas incubés avec l'anticorps contre la protéine d'intérêt.

- Adapter la quantité de protéine afin d'obtenir 500 µg de protéines dans les tubes immunoprécipitation (IP) et dans les tubes témoins (T-) sans dépasser 500 µL de volume final. Faire de même dans les tubes Input afin d'obtenir 50 µg de protéines sans dépasser 50 µL de volume final. Cette étape se réalise dans le tampon utilisé pour l'extraction protéique (CER I et CER II pour les fractions cytoplasmiques, NER pour les fractions nucléaires et lysis buffer pour les protéines totales)
- Dans de nouveaux tubes annotés, déposer 5 µL de billes magnétiques (Dynabeads™ Protein G, ThermoFisher Scientific, ref : 10004D)
- Laver les billes en suivant la procédure suivante : 200 µL de TBST (un tampon de lavage), mélanger par retournement, centrifugation, aspiration du liquide puis dans 200 µL de LB, de tampons cytoplasmiques (189 µL de CER I et 11 µL de CER II) ou de tampon nucléaire en fonction des échantillons afin d'enlever les résidus provenant des billes
- Ajouter les 500 µg de protéines (IP et T-) sur les billes et incuber 20 minutes à 4°C sous rotation
- Préparer de nouveaux tubes annotés et transférer les extraits protéiques
- Ajouter 5 µL d'anticorps de la protéine d'intérêt (*cf tableau 7*) dans les tubes IP
- Laisser incuber 1 h à 4°C sous rotation
- Préparer de nouveaux tubes et déposer 25 µL de billes magnétiques
- Réaliser la même procédure de lavage que précédemment
- Déposer les extraits protéiques sur les billes et laisser incuber 1 nuit à 4°C sous rotation
- Centrifuger les tubes, aspirer le liquide et le jeter
- Réaliser 4 lavages des billes au PBS 1x
- Ajouter 50 µL de sodium disulfite (SDS) 1 % et faire chauffer les échantillons (IP et T-) à 95°C pendant 3 minutes
- Centrifuger les tubes et ajouter 12 µL de Laemmli 5x (*cf tableau 6*) dans tous les tubes (IP, T- et Input)
- Faire chauffer les tubes à 95°C pendant 3 minutes
- Centrifuger les tubes et récupérer les 62 µL d'extraits protéiques immunoprécipités ou T- dans des nouveaux tubes annotés
- Conserver les échantillons à -80°C jusqu'au Western Blot

Tableau 6 : Composition du Laemmli 5x.

Réactif	Fournisseur	Référence	Volume (mL) ou masse (g)
SDS en poudre (Lauryl Sulfate)	Sigma Aldrich	L4509	1,2
Glycérol	Sigma Aldrich	W252506	4,7
Tris-HCl 0,5 M pH 6,8	/	/	1,2
DTT en poudre	Sigma Aldrich	D0632	0,93
Bleu de bromophénol en poudre	Fluka AG	K3159	0,005
QSP 10 mL d'eau milliQ			

Tableau 7 : Anticorps utilisés pour l'immunoprécipitation.

Protéine	Hôte	Fournisseur	Référence
MS	Lapin	ProteinTech	25896-1-AP
MAT2A	Lapin	Novus	NB110-94158
SIRT1	Souris	Cell Signaling	8469-S

Fiche 8 : Western Blot

Préparation des différentes solutions

Tableau 8 : Préparation des différentes solutions de Western Blot.

Tampon de migration 10x			
Réactif	Fournisseur	Référence	Volume (mL) ou masse (g)
Tris 250 mM en poudre	Sigma Aldrich	T-6066	30
Glycine en poudre	Sigma Aldrich	G-7126	144
SDS 10%	Sigma Aldrich	L-4509	100
QSP eau milliQ 1 L – pH ≈ 8,3 (ne pas ajuster avec de l'HCl)			
Tampon de migration 1x : 100 mL tampon 10x QSP eau milliQ 1 L			
Tampon de transfert 10x			
Réactif	Fournisseur	Référence	Volume (mL) ou masse (g)
Tris 480 mM en poudre	Sigma Aldrich	T-6066	58,1
Glycine 390 mM en poudre	Sigma Aldrich	G-7126	29,3
SDS 10%	Sigma Aldrich	L-4509	37,5
QSP eau milliQ 1 L – pH ≈ 9,2 (ne pas ajuster avec de l'HCl)			
Tampon de transfert 1x : 100 mL de tampon 10x + 200 mL d'éthanol absolu QSP eau milliQ 1 L			
Tampon de lavage TBST 10x			
Réactif	Fournisseur	Référence	Volume (mL) ou masse (g)
Tris 200 mM en poudre	Sigma Aldrich	T-6066	24,2
NaCl 1,5 M en poudre	Sigma Aldrich	59888	87,5
QSP eau milliQ 1 L – pH=7,4 à ajuster avec de l'HCl			
Tampon de lavage TBST 1x : 100 mL de tampon 10x + 1 mL de Tween 20 à 0,01% QSP eau milliQ 1 L			
Solutions de préparation des gels			
Réactif	Fournisseur	Référence	Volume (mL) ou masse (g)
Tris-HCl 1,5 M en poudre pH 8,8	Sigma Aldrich	T-6066	18,165
Tris-HCl 0,5 M en poudre pH 6,8	Sigma Aldrich	T-6066	6,055
QSP eau milliQ 100 mL – pH=8,8 ou 6,8 à ajuster avec de l'HCl			
Tampon citrate 0,1 M			

Réactif	Fournisseur	Référence	Volume (mL) ou masse (g)
Sodium citrate dihydrate 294,1 g/mol en poudre	Sigma Aldrich	W302600	24,269
Acide citrique 192,12 g/mol en poudre	Sigma Aldrich	W230618	3,368
QSP eau milliQ 1 L – pH = 6 à ajuster avec de l'HCl			
Tampon citrate 0,01 M : 100 mL de tampon 0,1 M QSP eau milliQ 1 L			

Une fois préparées, toutes les solutions ont été filtrées sur des filtres de 0,22 µM et conservées à 4°C.

Préparation des gels

- Réaliser le montage des plaques (spacer de 1,5 mm et plaque fine) Mini-Protean III
- Préparer le gel de séparation en fonction du nombre de gels à réaliser et du pourcentage d'acrylamide voulu (*cf tableau 9*)
- Couler le gel en s'arrêtant au niveau bas du plastique vert en dessous de l'emplacement du peigne
- Déposer un léger film d'isopropanol (Sigma Aldrich, ref : I-9516) afin de lisser le gel et d'éviter la formation de bulles d'air
- Attendre la polymérisation du gel à température ambiante pendant environ 30 minutes
- Préparer le gel de concentration (*cf tableau 11*)
- Eliminer l'isopropanol et couler le gel de concentration
- Placer le peigne (10 ou 15 puits) en évitant la formation de bulles
- Laisser polymériser à température ambiante pendant environ 30 minutes
- Monter l'appareil en assemblant les deux supports de gel sur le système central et le placer dans une cuve d'électrophorèse
- Remplir le réservoir central (cathode) jusqu'en haut ainsi que la cuve avec du tampon de migration 1x (*cf tableau 8*)

Tableau 9 : Solution pour préparation des gels de séparation pour SDS-PAGE Tris/Glycine Acrylamide 40%.

		1 gel	2 gels	3 gels	4 gels
Gel de séparation		10 mL	20 mL	30 mL	40 mL
6%	Eau milliQ	5,8	11,6	17,4	23,2
	Acrylamide mix 29 :1	1,5	3	4,5	6
	Tris 1,5 M pH 8,8	2,5	5	7,5	10
	SDS 10 %	0,1	0,2	0,3	0,4
	APS 10%	0,1	0,2	0,3	0,4
	TEMED	0,008	0,016	0,024	0,032

8%	Eau milliQ	5,3	10,6	15,9	21,2
	Acrylamide mix 29 :1	2	4	6	8
	Tris 1,5 M pH 8,8	2,5	5	7,5	10
	SDS 10 %	0,1	0,2	0,3	0,4
	APS 10%	0,1	0,2	0,3	0,4
	TEMED	0,008	0,012	0,018	0,024
10%	Eau milliQ	4,8	9,6	14,4	19,2
	Acrylamide mix 29 :1	2,5	5	7,5	10
	Tris 1,5 M pH 8,8	2,5	5	7,5	10
	SDS 10 %	0,1	0,2	0,3	0,4
	APS 10%	0,1	0,2	0,3	0,4
	TEMED	0,004	0,008	0,012	0,016
12%	Eau milliQ	4,3	8,6	12,9	17,2
	Acrylamide mix 29 :1	3	6	9	12
	Tris 1,5 M pH 8,8	2,5	5	7,5	10
	SDS 10 %	0,1	0,2	0,3	0,4
	APS 10%	0,1	0,2	0,3	0,4
	TEMED	0,004	0,008	0,012	0,016
15%	Eau milliQ	3,5	7,1	10,6	14,2
	Acrylamide mix 29 :1	3,8	7,5	11,3	15
	Tris 1,5 M pH 8,8	2,5	5	7,5	10
	SDS 10 %	0,1	0,2	0,3	0,4
	APS 10%	0,1	0,2	0,3	0,4
	TEMED	0,004	0,008	0,012	0,016

Tableau 10 : Référence des réactifs utilisés pour la préparation des gels de concentration et de séparation.

Réactif	Fournisseur	Référence
Ammonium persulfate (APS)	Sigma Aldrich	A-3678
TEMED	Carlo Erba	600461
Tween 20	Sigma Aldrich	P-1379

Tableau 11 : Solution pour la préparation des gels de concentration pour SDS-PAGE Tris/Glycine Acrylamide 40%.

		1 gel	2 gels	3 gels	4 gels
Gel de concentration		4 mL	8 mL	12 mL	16 mL
6%	Eau milliQ	2,92	5,83	8,75	11,66
	Acrylamide mix 29 :1	0,5	1	1,5	2
	Tris 1,5 M pH 8,8	0,5	0,5	0,5	0,5
	SDS 10 %	0,04	0,04	0,04	0,04
	APS 10%	0,04	0,04	0,04	0,04
	TEMED	0,004	0,004	0,004	0,004

Préparation des échantillons

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

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

Pour une plus belle migration, déposer à quantité et volume constants.

- Calculer le volume de tampon de lyse nécessaire pour obtenir 30 µg de protéine
- Ajouter 20% de dithiothréitol (DTT, Sigma Aldrich, ref : D0632) et 80% de Laemmli 2x (Sample Buffer Laemmli 2x, Sigma Aldrich, ref : S-3401)
- Vortexer et centrifuger rapidement
- Faire chauffer à 95°C pendant 5 minutes
- Remplacer les échantillons sur glace jusqu'au dépôt dans le gel
- Déposer 30 à 60 µL d'échantillons par puits en fonction de la taille des puits

Migration

- Faire migrer à 90V pendant 30 minutes (passage des échantillons dans le gel de concentration)
- Faire migrer ensuite à 110 V pendant environ 1h30 à voltage constant
- Arrêter la migration quand le front de migration arrive en bas des plaques

Electro-transfert semi-liquide

- Découper la membrane à la dimension du gel (8*6 cm) (*cf tableau 12*)
- Découper 6 papiers buvard par gel et les placer dans du tampon de transfert 1x
- Activer la membrane PVDF dans de l'éthanol absolu pendant 30 secondes
- Equilibrer les membranes nitrocellulose et PVDF dans du tampon de transfert 1x
- Dans les cassettes de transfert (BioRad), déposer 3 papiers buvard
- Déposer ensuite la membrane sur les papiers buvard
- Démontez l'appareil de migration, décollez les plaques et coupez le gel de concentration. Placer le gel de séparation dans le tampon de transfert 1x afin d'éliminer les traces de SDS qui pourraient interférer lors du transfert
- Placer le gel sur la membrane et éliminer les bulles de formant entre les deux

- Déposer de nouveau 3 papiers buvard sur le gel en veillant à ne pas créer de nouvelles bulles
- Refermer la cassette de transfert
- Déposer la cassette dans l'appareil de transfert et réaliser le transfert à 25 V pendant 30 minutes, intensité constante

Tableau 12 : Références des membranes utilisées pour le transfert.

Membrane	Fournisseur	Référence
Immobilon TM-P (PVDF)	Millipore	IPVH00010
Nitrocellulose	Amersham	RPN2236

Vérification du transfert (optionnel)

- Sortir la membrane de la cassette de transfert et la placer dans de l'eau distillée
- Réaliser 3 à 4 rinçage rapide à l'eau distillée afin d'éliminer les traces d'éthanol présentes lors du transfert
- Réaliser une coloration de la membrane avec une solution de Rouge Ponceau S (solution aqueuse de Rouge Ponceau à 0,2% (p/v), acide acétique 0,1 (v/v), filtrée à 0,2 µm, stockée à 4°C) (Sigma Aldrich, ref : P-3504) pendant 5 minutes sous agitation lente
- Réaliser 2 à 3 lavages à l'eau distillée et visualiser les bandes

Démasquage des sites antigéniques (tampon citrate)

- Faire chauffer du tampon citrate 0,01 M au bain marie à 95 °C
- Placer la membrane dans le tampon citrate 0,01 M à 95°C et laisser incuber pendant 20 minutes
- Placer ensuite la membrane dans du tampon citrate 0,01 M à température ambiante pendant 10 minutes sous agitation lente
- Réaliser 3 lavages de 5 minutes à l'eau distillée sous agitation rapide

Blocage

- Réaliser les solutions de blocage dans du tampon TBST 1x : 5% de lait écrémé ou 5% d'albumine bovine fraction V (BSA, Euromedex, ref : 04-100-810C)
- Déposer la solution de blocage sur la membrane et laisser incuber à température ambiante sous agitation lente pendant 1 h

Incubation des anticorps primaires

- Préparer une pochette en plastique légèrement plus grande que la membrane
- Préparer la solution d'anticorps primaire à la dilution souhaitée dans le tampon de blocage (lait ou BSA) : préparer 10 mL de solution pour une membrane entière (*cf tableau 13*)
- Placer la membrane dans la pochette et verser la solution d'anticorps primaire
- Souder les côtés de la pochette et incuber pendant 1 nuit à 4°C sous agitation lente

Tableau 13 : Conditions d'utilisation des anticorps de Western Blot.

Protéine	Référence	Fabricant	Pourcentage gel de séparation	Membrane de transfert	Blocage	Dilution anticorps primaire	Hôte
MS	ab66039	Abcam	8%	PVDF 0,2 µm	Lait 5%	1/1000	Lapin
MSR	ab129159	Abcam	8%	PVDF 0,2 µm	Lait 5%	1/1000	Lapin
MAT1A	67408-1-AG	ProteinTech	8%	Nitrocellulose 0,2 µm	Lait 5%	1/1000	Souris
MAT2A	NB110-94158	Novus	8%	Nitrocellulose 0,2 µm	Lait 5%	1/1000	Lapin
MAT2A	NBP1-28605	Novus	8%	Nitrocellulose 0,2 µm	Lait 5%	1/1000	Souris
MAT2B	NBP1-82797	Novus	8%	PVDF 0,2 µm	BSA 5%	1/1000	Lapin
MAT2B	15952-1-AP	ProteinTech	8%	Nitrocellulose ou PVDF 0,2 µm	Lait 5%	1/1000	Lapin
DNMT1	NB300-524	Novus	6%	Nitrocellulose 0,45 µm	BSA 5%	1/1000	Souris
O-N-AcGIC	NB300-524	Novus	6%	Nitrocellulose 0,45 µm	Lait 5%	1/1000	Souris
DNMT3b	NB300-516	Novus	8%	PVDF 0,2 µm	Lait 5%	1/1000	Lapin
SIRT1	8469-S	Cell Signaling	10%	Nitrocellulose 0,45 µm	Lait 5%	1/1000	Souris
HuR	07-468	Millipore	8%	PVDF 0,2 µm	Lait 5%	1/1000	Lapin

Lavages et incubation des anticorps secondaires

- Réaliser 3 lavages de 5 minutes au tampon TBST 1x sous agitation rapide à température ambiante
- Préparer une solution d'anticorps secondaires (Jackson ImmunoResearch 711-035-152 anti lapin HRP et 705-035-147 anti-souris HRP) à la dilution souhaitée (1/10 000) dans le tampon de blocage (lait ou BSA) : préparer 10 mL de solution pour une membrane entière (cf tableau 13)
- Incuber pendant 1 h à température ambiante sous agitation lente

Lavages et révélation

- Réaliser 4 lavages de 10 minutes au tampon TBST 1x sous agitation rapide à température ambiante
- Réaliser un mélange volume/volume de luminol et de peroxyde (Amersham Biosciences, ref : RPN2236)

- Placer la membrane légèrement égouttée sur une pochette plastique et la recouvrir du mélange ECL
- Placer à l'obscurité pendant 5 minutes
- Placer la pochette avec la membrane dans l'appareil de révélation iBright™ (iBright™ Analysis Software, Invitrogen) et se référer aux instructions du fabricant

Fiche 9 : Immunofluorescence

Coating à la poly-lysine (uniquement pour les cellules HepG2)

- Dans un plaque 24 puits ou 4 puits, placer 1 lamelle en verre par puits
- Diluer au 1/1000 la poly-lysine (Sigma Aldrich, ref : P2636) dans de l'eau stérile
- Répartir 500 µL de la solution par puits et laisser incuber 5 minutes à température ambiante
- Aspirer le liquide et réaliser 2 lavages à l'eau stérile
- Aspirer le reste de l'eau stérile et laisser sécher pendant 2 h à température ambiante

Ensemencement

- Après trypsination des cellules, réaliser un comptage automatique au bleu de trypan
- Ensemencer sur lamelles dans une plaque 24 puits ou 4 puits $4 \cdot 10^4$ cellules dans un volume final de 500 µL
- Incuber les cellules à 37°C sous atmosphère humide avec 5% de CO₂ pendant 1 nuit

Fixation au paraformaldéhyde (PFA) et perméabilisation des membranes

- Aspirer le milieu de culture et réaliser 3 lavages rapide au PBS 1x stérile
- Sous une hotte chimique, déposer 200 µL de PFA 4% (Sigma Aldrich, 818715) dans chaque puits et laisser incuber 10 minutes à température ambiante
- Réaliser ensuite 3 lavages de 5 minutes au PBS 1x
- Déposer 200 µL d'une solution de Triton 0,1% (Pharmacia Biotech 100x) dans chaque puits et laisser incuber 10 minutes à température ambiante
- Réaliser 3 lavages de 5 minutes au PBS 1x

Blocage

- Préparer la solution de blocage dans du PBS 1x avec 5% de BSA (BSA, Euromedex, ref : 04-100-810C) et 5% de SVF (SVF, Sigma Aldrich, ref : P30-3306).
- Déposer 200 µL par puits de solution de blocage et laisser incuber 1 h à température ambiante sous légère agitation

Incubation des anticorps primaires

- Préparer la solution d'anticorps primaire à la dilution souhaitée dans le tampon de blocage (*cf tableau 14*)
- Déposer 200 µL de la solution dans chaque puits et laisser incuber 1 nuit à 4°C sous agitation lente

Tableau 14 : Conditions d'utilisation des anticorps pour les marquages immunofluorescents.

Protéine	Référence	Fabricant	Hôte	Blocage	Dilution
MS	25896-1-AP	ProteinTech	Lapin	BSA 5%, SVF 5%	1/200
MSR	ab235354	Abcam	Lapin	BSA 5%, SVF 5%	1/100
MAT1A	67408-1-AG	ProteinTech	Souris	BSA 5%, SVF 5%	1/200
MAT2A	NB110-94158	Novus	Lapin	BSA 5%, SVF 5%	1/200
MAT2A	NBP1-28605	Novus	Souris	BSA 5%, SVF 5%	1/200
MAT2B	15952-1-AP	ProteinTech	Lapin	BSA 5%, SVF 5%	1/200
SIRT1	8469-S	Cell Signaling	Souris	BSA 5%	1/150
HuR	07-468	Millipore	Lapin	BSA 5%	1/100
Anti-lapin AlexaFluor 488	A11008	Jackson ImmunoResearch	Lapin	BSA 5%, SVF 5%	1/1000
Anti-souris AlexaFluor 594	A11005	Jackson ImmunoResearch	Souris	BSA 5%, SVF 5%	1/1000

Lavages et incubation des anticorps secondaires (à l'abri de la lumière)

- Réaliser 3 lavages de 5 minutes au PBS 1x à température ambiante
- Préparer une solution d'anticorps secondaires à la dilution souhaitée (1/1000) dans le tampon de blocage (*cf tableau 14*)
- Déposer 200 µL par puits de solution d'anticorps secondaire et laisser incuber 1 h à température ambiante sous légère agitation

Lavages, coloration des noyaux et montage des lames (à l'abri de la lumière)

- Réaliser 3 lavages de 5 minutes au PBS 1x à température ambiante
- Préparer la solution de DAPI (Santa Cruz Biotechnology, Ref : sc-300415) dilué au 1/3000 dans de l'eau milliQ
- Déposer 200 µL de solution dans chaque puits et laisser incuber 5 minutes à température ambiante sous légère agitation
- Réaliser 3 lavages de 5 minutes au PBS 1x puis 1 lavage de 5 minutes à l'eau milliQ à température ambiante
- Sur des lames annotées, déposer une goutte de liquide de montage (Invitrogen, ref : 00-4958-02)
- Egoutter rapidement la lamelle et venir la déposer face retournée sur le liquide de montage
- Eliminer les bulles formées entre la lame et la lamelle
- Laisser sécher à l'horizontale, 1 h à température ambiante puis 1 nuit à 4°C
- Réaliser la prise d'image au microscope confocal Nikon C2

Fiche 10 : Western capillaire (Wes)

L'analyse par western capillaire ou WES est une technique de dosage immunologique par capillarité basée sur le principe d'*Electro-Chemi-Luminescent Immuno Assay* (ECLIA). Cette méthode a été réalisée en utilisant le *Wes System* de *ProteinSimple* (ProteinSimple, San Jose, CA, USA) en accord avec les instructions du fabricant.

Préparation des réactifs

- Sortir les 3 tubes du Standard Pack (Bio-technie, PS-ST01EZ-8) et prendre un tube de 500 µL vide
- Ajouter 40 µL d'eau milliQ dans le tube incolore contenant du DTT, homogénéiser et centrifuger
- Ajouter 20 µL de Sample Buffer 10x et 20 µL de la solution de DTT 400 nM préparée dans le tube Master Mix 5x fluorescent (tube rose), homogénéiser et centrifuger
- Ajouter 20 µL d'eau milliQ dans le tube vert au culot rose contenant le marqueur de poids moléculaire biotinylé (Biotinylated ladder), homogénéiser et centrifuger
- Dans le tube de 500 µL réaliser une dilution au 1/100 du Sample Buffer 10x dans de l'eau milliQ, homogénéiser et centrifuger

Préparation des échantillons

- Préparer des dilutions des échantillons dans le Sample Buffer 0,1 afin d'obtenir une concentration finale d'échantillon de 0,2 µg/µL
- Ajouter une unité de Master Mix 5x fluorescent dans 4 unités de protéine dans un microtube afin d'avoir la concentration finale de 0,2 µg/µL
- Vortexer et centrifuger les échantillons puis dénaturer les protéines à 95°C pendant 5 minutes

Préparation des anticorps

- Préparer les solutions d'anticorps primaires à la dilution souhaitée dans du tampon de dilution des anticorps (*cf tableau 15*)
- Vortexer et centrifuger

Tableau 15 : Condition d'utilisation des anticorps de WES.

Protéine	Référence	Fabricant	Hôte	Dilution
Alpha-tubuline	2144-S	Cell Signaling	Lapin	1/50
TATA Box binding Protein (TBP)	ab63766	Abcam	Lapin	1/25
Citrate synthase	14309	Cell Signaling	Lapin	1/250
MS	25896-1-AP	ProteinTech	Lapin	1/50
MSR	ab129159	Abcam	Lapin	1/250
MAT1A	67408-1-AG	ProteinTech	Souris	1/250
MAT2A	NB110-94158	Novus	Lapin	1/250
MAT2B	NBP1-82797	Novus	Lapin	1/50
CSE	12217-1-AP	ProteinTech	Lapin	1/10

SIRT1	8469-S	Cell Signaling	Souris	1/100
-------	--------	----------------	--------	-------

Dépôt sur plaque de WES

- Après avoir bien vortexé et centrifugé tous les tubes, déposer sur la ligne A les échantillons (3 μL) en commençant par le marqueur de poids moléculaire biotinylé (5 μL)
- Déposer dans la ligne B le diluant d'anticorps dans tous les puits et dans le puits C1 (10 μL)
- Déposer dans la ligne C la solution d'anticorps primaire préparée précédemment (10 μL)
- Déposer en D1 la solution de streptavidine fournie dans le kit (10 μL)
- Déposer dans la ligne D la solution d'anticorps secondaire prête à l'emploi (Bio-technie, DM-001 ou DM-002) (10 μL)
- Réaliser à l'abri de la lumière un mélange luminol/péroxyde (v/v) et déposer dans chaque puits (15 μL)
- Déposer 500 μL de wash buffer dans les 3 première lignes prévues à cet effet (Bio-technie, SM-W001)
- Couvrir la plaque et centrifuger 5 minutes à 1000 g à température ambiante

Lacement de l'analyse

- Charger le plan de dosage dans le logiciel Compass for SW
- Ouvrir la porte de la machine Wes
- Retirer le couvercle de la plaque et retirer soigneusement le film de protection. Faire éclater les bulles d'air observées dans les puits de la matrice de séparation
- Placer la plaque de dosage sur le support de plaque
- Insérer une cartouche de capillaires dans e porte-cartouche
- Fermer la porte de la machine et lancer l'analyse

Fiche 11 : Duolink proximity ligation assay

La technique de Duolink est une technologie d'analyse de ligation à proximité (Proximity Ligation Assay). Elle permet de visualiser, de quantifier, et d'analyser des modifications de protéines et des interactions protéiques dans des cellules. Les cibles sont détectées par des anticorps primaires qui sont à leur tour reconnus par des anticorps secondaires conjugués à des oligonucléotides (sonde PLA MOINS et sonde PLA PLUS) (Sigma Aldrich, ref : DUO92004-100RXN et DUO92002-100RXN). Lorsque les sondes PLA sont suffisamment proches (28 Å), les brins d'ADN peuvent se lier à l'aide d'une solution de ligation composée des deux oligonucléotides et de la ligase. Ils sont ensuite amplifiés plusieurs centaines de fois grâce à une polymérase (Sigma Aldrich, ref : DUO92007-100RXN). L'ajout de sondes oligonucléotidiques complémentaires fluorescentes met en évidence le produit final. Le signal de chaque paire de sondes PLA détectée n'est produit que lorsque les deux sondes PLA sont à l'extrémité l'une de l'autre. Il est visualisé par des points fluorescents rouges individuels qui peuvent être quantifiés et localisés par microscopie confocale.

Attention 4 témoins sont à réaliser :

- **T-1** : témoin sans anticorps primaires et sans sondes PLA (+ et -)
- **T-2** : témoin sans anticorps primaire avec les sondes PLA (+ et -)
- **T-3** : témoin anticorps primaire 1 avec les sondes PLA (+ et -)
- **T-4** : témoin anticorps primaire 2 avec les sondes PLA (+ et -)

Préparation des solutions de lavages

Tableau 16 : Protocole de préparation des solutions de lavage de Duolink.

Tampon de lavage A			
Réactif	Fournisseur	Référence	Volume (mL) ou masse (g)
NaCl 1,5 M en poudre	Sigma Aldrich	S-9888	8,8
Tris 200 mM en poudre	Sigma Aldrich	T-6066	1,2
Tween 20	Sigma Aldrich	P-1379	0,5
QSP eau milliQ 1 L – pH = 7,4 à ajuster avec de l'HCl			
Tampon de lavage B			
Réactif	Fournisseur	Référence	Volume (mL) ou masse (g)
NaCl 1,5 M en poudre	Sigma Aldrich	S-9888	28,44
Tris 200 mM en poudre	Sigma Aldrich	T-6066	5,84
QSP eau milliQ 1 L – pH = 7,5 à ajuster avec de l'HCl			

Ensemencement

- Après trypsination des cellules, réaliser un comptage automatique au bleu de trypan
- Ensemencer sur lamelles dans une plaque 24 puits ou 4 puits 4×10^4 cellules dans un volume final de 500 μL
- Incuber les cellules à 37°C sous atmosphère humide avec 5% de CO_2 pendant 1 nuit

Fixation au paraformaldéhyde (PFA) et perméabilisation des membranes

- Aspirer le milieu de culture et réaliser 3 lavages rapide au PBS 1x stérile
- Sous une hotte chimique, déposer 200 μL de PFA (Sigma Aldrich, 818715) dans chaque puits et laisser incuber 10 minutes à température ambiante
- Réaliser ensuite 3 lavages de 5 minutes au PBS 1x
- Déposer 200 μL d'une solution de Triton 0,1% (Pharmacia Biotech 100x) dans chaque puits et laisser incuber 10 minutes à température ambiante
- Réaliser 3 lavages de 5 minutes au PBS 1x

Blocage

- Déposer 2 gouttes de solution de blocage dans chaque puits et laisser incuber 1 h à température ambiante sous légère agitation

Incubation des anticorps primaires

- Préparer la solution d'anticorps primaire à la dilution souhaitée dans le tampon de dilution des anticorps (*cf tableau 17*)
- Déposer uniquement le tampon de dilution des anticorps dans les puits T-1 et T-2
- Déposer l'anticorps 1 uniquement dans le T-3 et l'anticorps 2 dans le T-4
- Déposer un mélange des deux anticorps d'intérêt dans le puits Duolink
- Laisser incuber 1 nuit à 4°C sous légère agitation

Tableau 17 : Condition d'utilisation des anticorps de Duolink.

Protéine	Référence	Fabricant	Hôte	Dilution
MS	25896-1-AP	ProteinTech	Lapin	1/200
MAT2A	NBP1-28605	Novus	Souris	1/200
SIRT1	8469-S	Cell Signaling	Souris	1/150
MAT2B	NBP1-82797	Novus	Lapin	1/200

Lavages et dépôt des sondes PLA

- Réaliser 2 lavages de 5 minutes au tampon A à température ambiante
- Préparer une dilution des sondes PLA (+ et -) dans le tampon de dilution des anticorps
- Déposer 150 μL par puit de la solution sauf dans le puits T-1 où est déposé 150 μL de tampon de dilution des anticorps seul
- Incuber 1 h à 37°C

Lavages et ligation des sondes

- Réaliser 2 lavages de 5 minutes au tampon A à température ambiante
- Préparer le tampon de ligation dilué au 1/5 dans de l'eau milliQ

- Diluer la ligase au 1/40 dans le tampon de ligation dilué
- Déposer 150 µL de solution dans tous les puits
- Laisser incuber 30 minutes à 37°C

Lavages et amplification (à l'abri de la lumière)

- Réaliser 2 lavages de 5 minutes au tampon A à température ambiante
- Préparer le tampon d'amplification dilué au 1/5 dans de l'eau milliQ
- Diluer la polymérase au 1/80 dans le tampon d'amplification dilué
- Déposer 150 µL de solution dans tous les puits
- Laisser incuber 1h et 40 minutes à 37°C

Lavages, coloration des noyaux et montage des lames

- Réaliser 2 lavages de 10 minutes au tampon B à température ambiante
- Réaliser 1 lavage de 1 minute au tampon B 0,01x
- Préparer la solution de DAPI (Santa Cruz Biotechnology, Ref : sc-300415) diluée au 1/5000 dans de l'eau milliQ
- Préparer la solution de phalloïdine (Sigma Aldrich, ref : P2141) diluée au 1/100 dans de l'eau milliQ
- Déposer 100 µL de solution de DAPI et 100 µL de solution de phalloïdine dans tous les puits
- Laisser incuber 15 minutes à température ambiante sous légère agitation
- Réaliser 2 lavages de 5 minutes au tampon A à température ambiante
- Réaliser un lavage de 5 minutes à l'eau milliQ
- Sur des lames annotées, déposer une goutte de liquide de montage (Invitrogen, ref : 00-4958-02)
- Egoutter rapidement la lamelle et venir la déposer face retournée sur le liquide de montage
- Eliminer les bulles formées entre la lame et la lamelle
- Laisser sécher à l'horizontal, 1 h à température ambiante puis 1 nuit à 4°C
- Réaliser la prise d'image dans les 48 h au microscope confocal Nikon C2

Fiche 12 : Mesure de l'activité de la méthionine synthase : 5-meTHF marqué au ¹⁴C

La préparation des réactifs se fait avec de l'eau milliQ désoxygénée placée sous flux d'azote pendant 30 minutes.

Préparation des solutions

Tableau 18 : Préparation des solutions nécessaire à la fabrication du Mix réactionnel.

Réactif	Fournisseur	Référence	Volume (mL) ou masse (g)	Volume d'eau milliQ désoxygénée
NaOH 0,8 M en poudre	Sigma Aldrich	655104	0,320	10
HCl 0,4 M	Sigma Aldrich	30721	0,328	10
DTT 100 mM	Sigma Aldrich	D0632	0,0154	1
Tampon phosphate de potassium 1 M (KH ₂ PO ₄) en poudre	Sigma Aldrich	P5655	6,8	25
Pour le tampon phosphate de potassium, QSP 50 mL eau milliQ et ajuster le pH à 7,2 avec du KOH				

Homocystéine à 250 mM à partir d'homocystéine thiolactone :

- Dissoudre 375 mg d'homocystéine thiolactone (Sigma Aldrich, ref : 53530) dans 5 mL d'eau milliQ désoxygénée
- Ajouter 200 µL de NaOH 0,8 M préparé ci-dessus
- Incuber au bain marie à 45°C pendant 6 minutes
- Ajouter 250 µL d'HCl 0,4 M préparé ci-dessus
- Tamponner avec 500 µL de citrate de sodium 1 M à pH = 5
- Ajouter 3,81 mL d'eau milliQ désoxygénée, vortexer et aliquoter le mélange (conserver à -80°C)

Préparation du Mix réactionnel

Tableau 19 : Préparation du Mix réactionnel.

Volume réactionnel = 100 µL	C réaction	C stock	Volume (µL)
Protéines	/	/	60
Tampon phosphate de potassium 10x	0,1 M	1 M	10
DTT	25 mM	580 mM	4,31
Ascorbate	25 mM	720 mM	3,47

S- adénylméthionine	0,05 mM	20 mM	0,25
Méthylcobalamine	50 µM	5 mM	1
Homocystéine	5 mM	250 mM	2
[14C] 5-meTHF (PerkinElmer, ref : NEC846)	50 µM	2,5 mM	2
Eau milliQ QSP 30 µL	/	/	16,97

Préparation des échantillons

- Dans un tube de 1,5 mL réaliser le Mix réactionnel (cf tableau 18)
- Préparer une série de 3 tubes par échantillons (un tube par temps d'incubation : 20, 40 ou 60 minutes), 3 tubes pour le contrôle positif (foie de rat) et 3 tubes pour le témoin négatif (BSA)
- Déposer le volume nécessaire d'eau milliQ désoxygénée et de protéines afin d'obtenir 150 µg de protéine dans un volume de 60 µL
- Ajouter 40 µL de Mix réactionnel dans chaque tube
- Saturer chaque tube avec de l'azote gazeux avant de refermer le tube
- Incuber le mélange 20, 40 ou 60 minutes au bain marie à 37°C pour chaque série de tubes
- Dénaturer les enzymes en chauffant les tubes à 95°C pendant 5 minutes et replacer les tubes sur glace
- Centrifuger les tubes à 12 000 g pendant 10 minutes à température ambiante et récupérer le surnageant

Chromatographie liquide échangeuse d'anion

- Pendant ce temps, lavages les colonnes AG1x8 (échangeuse d'anion Cl⁻, BioRad) avec 5 mL d'HCl 0,5 N
- Equilibrer les colonnes avec 5 lavages de 2 mL d'eau milliQ
- Déposer les échantillons sur les colonnes puis rincer avec 3 lavages de 1 mL d'eau milliQ (*la [14C] méthionine est éluée en premier car non retenue par le gel de la colonne contrairement au [14C] 5-meTHF*)
- Les colonnes sont ensuite régénérées en faisant 3 lavages de 5 mL d'HCl 0,5 N (*élution du [14C] 5-meTHF*)

Dosage par comptage rayonnement β

- Déposer 1 mL des échantillons après chromatographie dans des tubes en polyéthynène (Packard)
- Ajouter 3 mL de liquide de scintillation Pico-Fluor 40 (PerkinElmer)
- Homogénéiser par retournement
- Placer les tubes dans un portoire du compteur de rayonnement β et lancer l'analyse

Fiche 13 : Analyse métabolomique par LCMS/MS

La chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse en tandem (LCMS-8045, Shimadzu) est une méthode analytique combinant la performance de la chromatographie liquide à un spectromètre de masse, permettant ainsi l'identification et/ou la quantification précise de divers composés comme des métabolites.

Préparation des échantillons

- Reprendre les culots secs de cellules totales et les culots sec de noyaux dans 100 μL de PBS 0,1x pour un culot d'environ 10 μL
- Broyer mécaniquement à l'aide d'une seringue de 1 mL et d'une aiguille de 25G et réaliser environ 10 allers-retours
- Réaliser 2 fois 15 minutes de bain à ultrasons à 4°C
- Prélever 50 μL de l'homogénats et les déposer dans un tube de 1,5 mL destinée à l'analyse LCMS/MS
- Conserver le reste de l'homogénats à -80°C

Préparation de la gamme de standard (STD 1 à 10) et des standards internes (ISTD)

Deux standards ont été utilisés. Le standard externe permet la réalisation d'une gamme de dilution en cascade de 11 points (dilution au $\frac{1}{2}$). Les standards internes quant à eux ont été déposés dans chaque tube échantillon. Ces standards internes ont pour but d'égaliser les mesures effectuées entre chaque échantillon.

- Prendre un tube de 1,5 mL et déposer les différents volumes de standards internes ISTD et du mélange DTT 0,6 M/formate d'ammonium 1M. Ce mélange a pour but de réduire les ponts dissulfures.

Tableau 20 : Préparation des standards internes (ISTD).

Standard interne	Fournisseur	Référence	Stock (nM)	Concentration (μM)	Volume (μL)
D3-Méthionine	Cambridge Isotope Laboratories	19I-0083	2	36	18
D3-SAM	LGC	TRC-A291532	1	16	16
D8-Homocystéine	Cambridge Isotope Laboratories	19K-0319	1	12	12
D3-SAH	LGC	TRC-A291532-1MG	0,5	6	12
D3-Sérine	Santa Cruz	70094-78-9	5	60	12
D9-Choline	Eurisotope	DLM-549-1	1	12	12

C13-meTHF	MedChemExpress	HY-113046S	0,25	4	12
D2-Cystéine	Cambridge Isotope Laboratories	19J-0657	1	15	15
D11-Bétaine	Cambridge Isotope Laboratories	20H-0554	5	60	12
QSP DTT/formate d'ammonium					879

- Prendre un tube de 1,5 mL afin de réaliser un pool de tous les composés qui sera ensuite dilué en cascade au ½ afin de constituer la gamme de standard

Tableau 21 : Préparation de la gamme de standards STD 1 à 10.

Standard interne	Fournisseur	Référence	Stock (nM)	Concentration (µM)	Volume (µL)
Homocystéine	Sigma	H-6010	1	10	10
Méthionine	Sigma	M-6039	20	75	3,75
SAM	Merck	A-7007	1	2,5	2,5
SAH	Merck	A-9384	0,5	0,5	1
Cystéine	Sigma	C-4022	30	60	2
Cystathionine	Merck	C-3633	1	75	75
Glutathion	Merck	G-4626	10	650	65
Diméthylglycine	Merck	D-6382	10	15	1,5
Choline	Merck	C-1879	10	40	4
Bétaine	Merck	B-2754	10	20	2
Glycine	Merck	G-7126	20	450	22,5
Sérine	Merck	S-4500	10	200	20
meTHF	Merck	AABH99A4341D	0,25	0,25	1
Acide folique	Sigma	F-7876	0,25	0,25	1
Glutamate	Sigma	G-1251	10	700	70
Volume de matrice PBS 0,1x pour dilution					718,75

Préparation des dépôts

- Prendre des tubes de 1,5 mL et les annoter selon le schéma suivant :
 - Tube 1 : blanc réactif
 - Tube 2 : blanc échantillon
 - Tube 3 à 12 : gamme de standard SDT 1 à 10
 - Tube 13 et 14 : contrôle externe (plasma du CHRU de Nancy) QC1 et QC2
 - Tube 15 et ...etc. : échantillons
- Déposer les volumes d'échantillons ou de gamme dans chaque tube puis ajouter les standards internes ISTD

Tableau 22 : Dépôts dans chaque tube.

	Blanc réactif	Blanc échantillon	SDT 1 à 10	QC1 et QC2	Echantillons
Volume échantillons ou gamme (µL)	50 µL d'eau milliQ	50 µL de PBS 0,1x	50	50	50
ISTD (µL)	10 µL du mélange DTT/formate d'ammonium seul	10 µL du mélange DTT/formate d'ammonium seul	10	10	10

- Vortexer les tubes et laisser incuber 10 minutes à température ambiante
- Ajouter dans chaque tube 60 µL de méthanol acidifié (acide formique 0,1%) afin de faire précipiter les débris
- Vortexer et incuber 30 minutes à 4°C
- Vortexer et centrifuger à 20 000 g à 4°C pendant 30 minutes

Dépôt sur plaque

- Récupérer 25 µL de surnageant de chaque tube et déposer en simplicité dans une plaque 96 puits
- Ajouter dans chaque puits un mélange d'eau milliQ et d'aide formique 0,1%
- Souder la plaque et la placer dans l'appareil (Shimadzu LMCS 8045, ESI Triple quadripôle)

Les résultats sont ensuite traités sur le logiciel Insight (Shimadzu). Les valeurs des concentrations ont été calculées à partir de l'air sous la courbe et selon les droites de concentrations obtenues pour chacun des métabolites par les standards externes. Les concentrations de chaque échantillon ont ensuite été normalisées par rapport aux concentrations des standards internes. Afin d'exprimer le résultat du dosage des métabolites en µmol/g, les valeurs obtenues ont été normalisées grâce aux concentrations protéiques des échantillons.

Fiche 14 : Incorporation d'homocystéine deutérée (Hcy-D4) et mesure au LCMS/MS

Incorporation sur cellules vivantes

Les cellules sont mises en prolifération dans 2 types de milieux contenant soit de l'homocystine-D8 (50 µM) et de la cobalamine (50 µM), soit de la méthionine (30mg/L), de l'homocystine-D8 (50µM) et de la cobalamine (50 µM).

Préparation des solutions stock

- L-Méthionine (3 g/L, 100x) : dissoudre 30 mg/10 mL H₂O, filtrer sous hotte et stocker à -20°C par aliquots (1 mL)
- L-Cystéine (20 mM, 100x) : dissoudre 31 mg/10 mL H₂O, filtrer sous hotte et stocker à -20°C par aliquots (1 mL)
- OH-B12 (0.5 mM, 100x) : dissoudre 6.9 mg/10 mL H₂O, stocker par aliquot 1 mL à l'abri de la lumière (idéalement dans des tubes noirs).
- D,L-Homocystine-D8 (5 mM, 100x) : dissoudre complètement 13.8 mg/9.9 mL HCl 0.1N, puis ajouter 0.1 mL de NaOH 10N. Vérifier l'absence précipité. Filtrer sous hotte et stocker à -20°C par aliquots (1 mL)

Préparation des milieux sélectifs

Tableau 23 : Composition des milieux sélectifs HB et MHB.

Composés	Milieu HB (100 mL)	Milieu MHB (100 mL)
DMEM Gibco ref.21013 (w/o Met, Cys, Gln, Pyr)	84 mL	83 mL
SVF dialysé	10 mL	10 mL
Pyruvate (100 mM, 100x)	1 mL	1 mL
Peni/Strepto 100x	1 mL	1 mL
L-Méthionine (3 g/L, 100x)	-	1 mL
L-Cystéine (20 mM, 100x)	1 mL	1 mL
Glutamine (400 mM, 100x)	1 mL	1 mL
OH-B12 (0.5 mM, 100x)	1 mL	1 mL
D,L-homocystine-D8 (5 mM, 100x)	1 mL	1 mL

Croissance des cellules : Milieu HB vs MHB

- T0 (jeudi) = Ensemencement 12.000 cell/cm², milieu de croissance standard
- T+24h (vendredi) = rinçage avec D-PBS 1x et changement pour milieu sélectif
- T+96h (lundi) = arrêt de croissance. Trypsination, Lavage D-PBS 1x et congélation des culots secs -80°C.

Incorporation *in vitro* sur fractions cytoplasmiques et nucléaires

Préparation des échantillons

- Pour cette expérience il est nécessaire de pooler 4 culots secs de noyaux et d'utiliser une fraction cytoplasmique issus d'un fractionnement de $10 * 10^6$ cellules.
- Reprendre les 4 culots secs nucléaires dans 300 μ L de PBS 0,1 x supplémenté avec 1% de PIC
- Réaliser un broyage mécanique avec une seringue et une aiguille de 26G en réalisant environ 15 allers-retours et en incubant sur glace
- Réaliser 2 bains à ultrasons de 15 minutes à 4°C
- Centrifuger 30 minutes à 4°C à 12 000 g
- Récupérer le surnageant correspondant à la fraction nucléaire
- Réaliser une ultrafiltration des fractions cytoplasmiques et nucléaires avec des colonnes d'ultrafiltration (ref : YM10) en suivant les recommandations du fournisseur
- Réaliser 3 lavages de 500 μ L au PBS 0,1 x et de nouveau centrifuger les colonnes d'ultrafiltration
- Récupérer 50 μ L d'extraits protéiques cytoplasmiques et nucléaires concentrés
- Ajouter 50 μ L de PBS 0,1 x supplémenté avec 2% de PIC et réaliser un dosage de protéines via la méthode BCA décrite précédemment

Préparation du mix réactionnel

- Réaliser le mélange réactionnel suivant composés des différents produits nécessaires à reproduire *in vitro* le métabolisme des monocarbone

Tableau 24 : Préparation du mix réactionnel pour l'incorporation d'homocystéine deutérée *in vitro*.

Composés	Concentration réaction (mM)	Concentration stock (mM)	Volume (μ L)
Protéines (μ g)	/	/	33,7
Tampon KH/K ₂ HPO ₄ pH 7,5	100	1000	5
MgCl ₂ (H ₂ O)	20	500	2
KCl (H ₂ O)	50	3000	0,8
DTT (H ₂ O)	25	500	2,5
Vitamine C (H ₂ O)	25	500	2,5
Sérine (H ₂ O)	1	100	0,5
PLP H ₂ O (HCl 1N)	1	100	0,5
NADPH, Na ₄ (H ₂ O)	0,1	10	0,5
MeTHF, Na ₂ (H ₂ O)	0,1	10	0,5
OH-B12 (H ₂ O)	0,05	5	0,5
ATP-Na ₂ (H ₂ O)	1	100	0,5

D8-homocystéine (HCl 1N)	0,5	50	0,5
QSP H ₂ O 16,3 µL			

- Ajuster la quantité de protéine pour obtenir 100 µg de protéines dans 33,7 µL
- Dans chaque tube échantillons déposer 33,7 µL de protéines et 16,3 µL de mix réactionnel
- Incuber 60 minutes à 37°C
- Arrêter la réaction par ajout de 5 µL d'acide acétique 1N

Analyse métabolomique

- Réaliser la préparation des gammes de standards et standards internes comme décrit précédemment et déposer les échantillons dans la plaque
- Paramétrer l'analyse OCM selon les modifications ci-dessous :

Tableau 25 : Paramètres de l'analyse pour le métabolome du métabolisme des monocarbone (OCM).

Composés	Précurseur m/z	Produit m/z	Dwell time (msec)	Q1 PreBias (V)	CE	Q1 PreBias (V)
Homocysteine	135.8	90.1	27	-10	-13	-18
Homocysteine	135.8	56.1	27	-10	-22	-21
D4-Homocysteine	140.1	94.1	27	-22	-12	-18
D4-Homocysteine	140.1	59.3	27	-15	-20	-24
Methionine	149.9	56.2	27	-13	-16	-23
Methionine	149.9	104.0	27	-13	-12	-21
Methionine-D4	153.9	56.2	27	-10	-17	-22
Methionine-D4	153.9	108.0	27	-10	-13	-22
SAM	399.1	250.1	27	-15	-16	-18
SAM	399.1	136.1	27	-15	-30	-29
SAM-D4	403.1	250.2	27	-11	-15	-27
SAM-D4	403.1	136.1	27	-11	-26	-25
SAH	384.8	134.1	27	-15	-19	-14
SAH	384.8	136.1	27	-18	-19	-14
SAH-D4	388.8	136.1	27	-28	-20	-26
SAH-D4	388.8	138.1	27	-27	-19	-25
Cystathionine	222.9	134.0	27	-11	-12	-26
Cystathionine	222.9	88.0	27	-11	-24	-17
Cystathionine-D4	226.9	134.0	27	-11	-12	-26
Cystathionine-D4	226.9	138.0	27	-11	-12	-26
Cystathionine-D4	226.9	88.0	27	-11	-24	-17

Fiche 15 : Construction plasmide MTR 144 kDa et transfection dans cellules HEK

Construction du plasmide

Les ADNc codant pour MTR 140-kDa et 124-kDa ont été sous-clonés dans pEGFP-C2 à partir du clone MGC MHS6278-213245760 (Dharmacon™ Reagents, Horizont Discovery). Ce clone contient l'ADNc complet *MTR* (GenBank : BC130616.1) inséré dans le vecteur pCR-XL-TOPO. Pour la construction MTR 140-kDa, le clonage a été réalisé à l'aide du kit In-Fusion® Snap Assembly (Takara).

L'ADNc *MTR* a dans un premier temps été amplifié à partir du clone MGC à l'aide des amorces OND92 (5'- ATTCTGCAGTCGACGATGTCACCCGCGCTCCAA-3') et OND93 (5'- TAGATCCGGTGGATCTTAGTCTGTATCATATCCCAA). Le produit PCR a ensuite été inséré dans le vecteur pEGFP-C2 préalablement digéré par *Sall* et *BamHI*.

Pour la construction MTR 124-kDa, les régions contenant les exons 1 à 15 et 19 à 33 ont été amplifiées à l'aide des couples OND1 (5'- CCGCCTCGAGATGTCACCCGCGCTCCAAGAC-3')/OND23 (5'- cctaagcttCTGTCCTTCTTCATCAAAAGC-3') et OND27 (5'- CCTAAGCTTACTCAAGGCACAGGAGGGAAG-3')/OND2 (5'- TTGGATCCTTAGTCTGTATCATATCC-3') respectivement.

Les deux produits PCR ont été insérés séquentiellement dans le vecteur pEGFP-C2. Dans un premier temps, les exons 19 à 33 ont été ligués dans le vecteur pEGFP-C2 digéré par *HindIII* et *BamHI* à l'aide de T4 DNA ligase (New England Biolabs). Dans un deuxième temps, les exons 1 à 15 ont été insérés dans le vecteur intermédiaire obtenu digéré par *XhoI* et *HindIII* à l'aide de T4 DNA ligase. Après transformation, les clones positifs ont été vérifiés par séquençage (Eurofins).

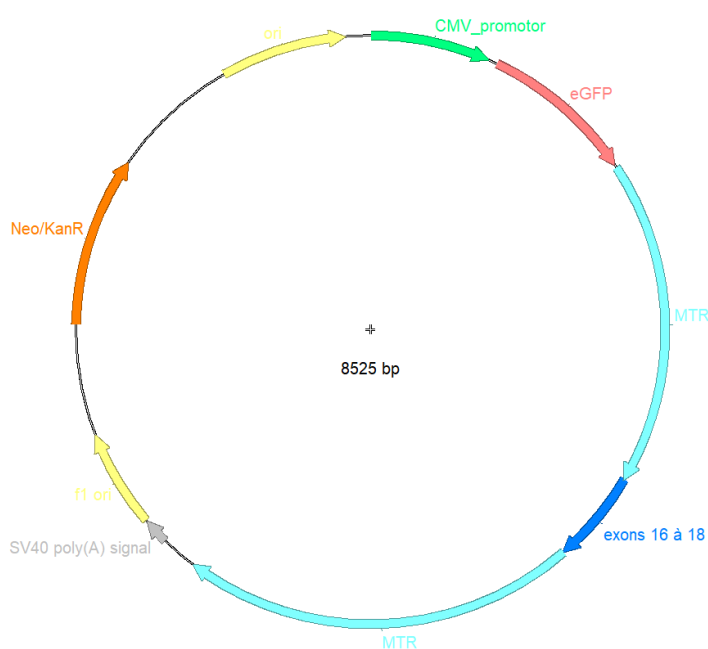


Figure 88 : Carte du plasmide MTR-GFP 140-kDa.

PCR

- Déposer dans un tube le réactif CloneAmp HiFi PCR Premix (Takara, ref : 639298) et les amorces (*cf tableau 26*)
- Déposer le volume calculé de plasmide dans le tube afin d'obtenir 50 ng d'ADN
- Compléter le volume pour obtenir un volume de 25 µL final
- Lancer le thermocycleur avec le programme décrit dans le tableau 20

Tableau 26 : Préparation des échantillons et du MIX pour réaliser la PCR.

Réactif	Volume (µL)
CloneAmp HiFi PCR Premix	12,5
Amorce F	0,5
Amorce R	0,5
Plasmide (50 ng)	50/[concentration en ng/µL]
QSP 25 µL eau RNase free	

Tableau 27 : Programme de PCR.

Température (°C)	Temps (s)
98	10
55	15
72	30
35 cycles	

- A la fin de la PCR, remettre les tubes sur glace
- Ajouter 1 µL de l'enzyme de restriction DpnI
- Laisser incuber 30 minutes à 37°C

Gel d'agarose

- Réaliser un gel d'agarose à 0,8% d'agarose et ajouter 5 µL d'intercalant MidoriGreen (Dustcher, ref : 523268)
- Faire migrer le produit de PCR à 90 V pendant 70 minutes

Traitement cloning enhancer

- Déposer dans de nouveaux tubes 5 µL de produit de PCR et ajouter 2 µL de réactif cloning enhancer (Takara, ref : 639298)
- Réaliser un cycle au thermocycleur de 25 minutes à 37°C suivi de 15 minutes à 80°C
- Placer le tube sur glace

Préparation des boîtes de pétri LB-agar + kanamycine

Toutes les étapes après l'autoclave des solutions sont réalisées sous hotte décontaminée à l'éthanol ou sur palliase décontaminée en présence d'une flamme.

- Réaliser le milieu LB liquide et LB agar (*cf tableau 28*)
- Agiter les solutions obtenues

- Autoclaver puis stocker le milieu LB liquide à 4°C quand celui-ci sera refroidi
- Attendre que le milieu LB-agar refroidisse (≈60°C) et ajouter 50 µg/mL de kanamycine
- Verser environ 10 mL de milieu par boîte de pétri
- Stocker à 4°C

Tableau 28 : Préparation des milieux LB liquide et agar pour la culture bactérienne.

Milieu LB liquide			
Réactif	Fournisseur	Référence	Concentration (g/L)
NaCl	Sigma Aldrich	S-9888	10
Tryptone	Sigma Aldrich	T-2559	10
Extrait de levures	/	/	5
Milieu LB-agar			
Réactif	Fournisseur	Référence	Concentration (g/L)
NaCl	Sigma Aldrich	S-9888	10
Tryptone	Sigma Aldrich	T-2559	10
Extrait de levures	/	/	5
Agar	Sigma Aldrich	A5054	1,5%

In-Fusion Cloning

- Déposer 5 µL de produit de PCR traité au cloning enhancer
- Ajouter 2 µL de Master Mix 5x (Takara, ref : 639298)
- Compléter avec de l'eau milliQ pour obtenir un volume final de 10 µL
- Laisser incubé 15 minutes à 50°C
- Remettre le tube sur glace
- Prélever 2,5 µL de la réaction et la placer dans un tube Falcon de 15 mL
- Ajouter 50 µL de Stellar cells (Takara, ref : 636763)
- Incuber 30 minutes sur glace puis incubé 45 secondes à 42°C
- Incuber ensuite 2-3 minutes sur glace
- Ajouter 450 µL de milieu SOC (Takara, ref : 636763)
- Incuber 1 h à 37°C sous agitation
- Prélever 100 µL de la solution et déposer sur boîte de pétri LB kanamycine toute la nuit à 37°C

Repiquage et culture bactérienne

- Prendre une nouvelle boîte de pétri contenant du LB agar + kanamycine
- Repiquer les bactéries à l'aide d'un cône sur la nouvelle gélose
- Placer le cône dans un tube à essai contenant du milieu LB liquide + kanamycine
- Incuber la boîte de pétri et le tube à essai pendant 1 nuit à 37°C (sous agitation pour le tube)

Mini prep (kit Plasmid Plus QIAGEN Mini prep)

L'extraction d'ADN plasmidique est effectuée à l'aide du kit QIAGEN® Plasmid Plus Mini Kit (Qiagen, ref : 27106).

- Prélever 1,5 mL de culture bactérienne dans le tube à essai
- Centrifuger 2 à 3 minutes à 8 000 rpm
- Aspirer le surnageant
- Resuspendre le culot bactérien dans 250 µL de solution 1
- Ajouter 250 µL de solution 2 et mélanger par retournement sans dépasser 5 minutes de mélange
- Ajouter 350 µL de solution 3 et mélanger par retournement. Des débris blancs vont se former
- Centrifuger 5 minutes à 8 000 rpm
- Préparer des tubes avec les colonnes bleues
- Récupérer le surnageant et le placer sur la colonne
- Centrifuger 1 minute à 8 000 rpm
- Eliminer le liquide du tube collecteur
- Replacer la colonne sur le tube collecteur et réaliser un lavage avec 500 µL de tampon PB
- Centrifuger 1 minute à 8 000 rpm
- Eliminer de nouveau le liquide du tube collecteur
- Replacer la colonne sur le tube collecteur et réaliser un lavage avec 750 µL de tampon PE
- Centrifuger 1 minute à 8 000 rpm
- Eliminer de nouveau le liquide du tube collecteur
- Placer la colonne sur un nouveau tube de 1,5 mL et éluer avec 50 µL d'eau milliQ
- Centrifuger 1 minute à 8 000 rpm
- Jeter la colonne et réaliser un dosage de la quantité d'ADN récolté au spectrophotomètre à 260 nm

Digestion

- Préparer le Mix de digestion (*cf tableau 29*)
- Déposer 5 µL de Mix dans un tube
- Ajouter 5 µL de produit de PCR mini prep
- Laisser incuber 1 h à 37°C
- Replacer le tube sur glace

Tableau 29 : Préparation du Mix de digestion.

Réactif	Fournisseur	Référence	Volume (µL)
Tampon enzyme de restriction	Qiagen	27106	1
Enzyme de restriction Pst1	Invitrogen	15215-023	0,5
QSP eau milliQ 5 µL*nombre de tube			

Midi prep (kit Plasmid Plus QIAGEN Midi prep)

L'extraction d'ADN plasmidique est effectuée à l'aide du kit QUAGEN® Plasmid Plus Midi Kit (Qiagen, ref : 12145).

- Récupérer les bactéries et centrifuger à 4 500 g pendant 5 à 10 minutes et jeter le surnageant
- Resuspendre le culot bactérien dans 8 mL de tampon RES + RNase et bien homogénéiser
- Ajouter 8 mL de tampon LYS et mélanger doucement par retournement (\approx 5 retournements)
- Incuber pendant 5 minutes à température ambiante
- Placer la colonne au-dessus d'un tube collecteur et placer le filtre dedans
- Equilibrer la colonne et le filtre avec 12 mL de tampon EQU
- Laisser la colonne se vider par gravité
- Ajouter 8 mL de tampon NEU à la suspension bactérienne
- Mélanger immédiatement par retournement jusqu'à disparition complète de la couleur bleue
- Déposer le lysa bactérien sur le filtre de la colonne
- Laisser la colonne se vider par gravité
- Réaliser une première étape de lavage en déposant 5 mL de tampon EQU sur le filtre
- Laisser la colonne se vider par gravité et éliminer le filtre
- Réaliser une seconde étape de lavage directement sur la colonne avec 8 mL de tampon WASH
- Laisser la colonne se vider par gravité
- Placer la colonne sur un nouveau tube collecteur
- Réaliser l'élution de l'ADN plasmidique en ajoutant 5 mL de tampon EQU sur la colonne
- Laisser la colonne se vider par gravité
- Retirer la colonne et ajouter 3,5 mL d'isopropanol à température ambiante
- Vortexer énergiquement
- Allotuer les 8,5 mL de liquide dans 8 tubes
- Centrifuger à 15 000 g pendant 30 minutes à température ambiante
- Aspirer le surnageant précautionneusement
- Réaliser une étape de lavage à l'éthanol 70% des culots en déposant 200 μ L d'éthanol
- Centrifuger à 15 000 g pendant 5 minutes à température ambiante
- Aspirer l'éthanol et reprendre les culots dans 200 μ L d'eau milliQ (pooler les culots dans le même tube)
- Doser la concentration en ADN plasmidique récupéré au spectrophotomètre à 260 nm

Transfection dans des cellules HEK

Jour 1

- Reprendre les cellules HEK dans leur milieu afin de les décoller du support de culture
- Placer des lamelles pour réaliser une immunofluorescence dans chaque puits

- Réaliser une dilution au 1/5 et les ensemercer dans une plaque 6 puits
- En parallèle, réaliser une dilution du plasmide mère afin d'obtenir une concentration de 100 ng/μL
- Laisser incuber 1 nuit à 37°C sous atmosphère humide avec 5% de CO₂

Jour 2

- Préparer des tubes de 1,5 mL et déposer 10 μL de plasmide à 100 ng/μL, 25 μL de PBS SK, 75 μL de NaCl et compléter avec de l'eau stérile pour avoir un volume final de 100 μL
- Dans un nouveau tube mélanger 6 μL de Jet Pei (PolyPlus, ref : 101000053) et 94 μL de NaCl
- Déposer 100 μL du mélange Jet Pei dans les tubes contenant le plasmide
- Vortexer et laisser incuber 30 minutes à température ambiante
- Prélever 200 μL du mélange ayant incubé et déposer au goutte à goutte directement dans le milieu de culture de la plaque 6 puits
- Laisser incuber 48 h à 37°C sous atmosphère humide avec 5% de CO₂

Jour 5

- Aspirer le milieu et le jeter
- Reprendre et décoller les cellules dans 1mL de PBS 1x stérile
- Centrifuger 5 minutes à 200 g à température ambiante
- Congeler les culots
- Ou réaliser un lavage au PBS 1x stérile des lamelles puis réaliser l'étape de fixation et de perméabilisation d'immunofluorescence.

Fiche 16 : Transfection de siRNA sur cellules HepG2

- Ensemencer entre 1 et 2×10^5 cellules par puits dans une plaque 6 puits dans du DMEM high glucose supplémenté avec 10 % de SVF et 1% d'antibiotiques
- Incuber 24 h à 37°C sous 5% de CO₂
- Diluer le siRNA T-, le siRNA T+ (siRNA contre la GAPDH) et le siRNA d'intérêt (MAT2A, Santa Cruz Animal Health, ref : sc-106203) dans du milieu Opti-MEM (ThermoFisher Scientific, ref : 31985062)
- Vortexer 10 secondes
- Ajouter l'INTERFERin reagent et vortexer de nouveau 10 s
- Incuber 10 minutes à température ambiante
- Sortir la plaque contenant les cellules, aspirer le milieu et réaliser un lavage du tapis cellulaire avec du milieu Opti-MEM
- Déposer de nouveau du milieu Opti-MEM dans la plaque et ajouter au gouttes à gouttes dans chaque puits le mélange siRNA/Opti-MEM/INTERFERin reagent
- Incuber à 37°C pendant 48 h
- Vérifier l'efficacité du siRNA par Western blot ou par IF

Day 0: Cell seeding

→ Seed cells in V mL of serum containing medium according to the table below

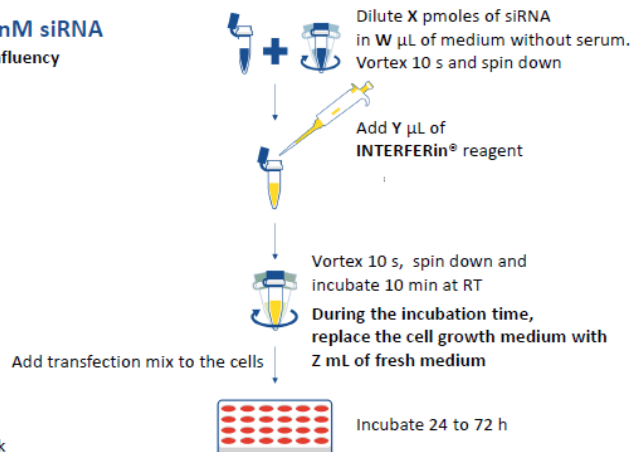
Quantities per well, dish or flask

Culture vessel	Number of cells*	V = volume of medium during transfection
96-well	2 500 – 7 500	0.2 mL
24-well	15 000 – 35 000	1 mL
12-well	30 000 – 70 000	2 mL
6-well / 35 mm	100 000 – 200 000	4 mL
100 mm / flask 75 cm ²	750 000 – 1.25 x 10 ⁶	15 mL

*For suspension cells, please refer to the complete protocol.

Day 1: Transfection = 1 nM siRNA

→ Transfect cells at 30-50% confluency



Quantities per well, dish or flask

Culture vessel	W = volume of medium without serum	X = amount of siRNA added (1 nM*)	Y = volume of INTERFERin [®] reagent	Z = volume of growth medium
96-well	50 µL	0.17 pmoles (2.4 ng)	0.75 ± 0.5 µL	0.125 mL
24-well	100 µL	0.6 pmoles (8.4 ng)	2 ± 1 µL	0.5 mL
12-well	200 µL	1.2 pmoles (17 ng)	4 ± 2 µL	1 mL
6-well / 35 mm	200 µL	2.2 pmoles (31 ng)	8 ± 4 µL	2 mL
100 mm / flask 75 cm ²	500 µL	10.5 pmoles (147 ng)	40 ± 10 µL	10 mL

*in final volume of culture.

Figure 89 : Protocole de transfection de siRNA avec l'INTERFERin reagent.

Fiche 17 : Marquage EdU couplé à IF MS

Coating à la poly-lysine (uniquement pour les cellules HepG2)

- Dans un plaque 24 puits ou 4 puits, placer 1 lamelle en verre par puits
- Diluer au 1/1000 la poly-lysine (Sigma Aldrich, ref : P2636) dans de l'eau stérile
- Répartir 500 µL de la solution par puits et laisser incuber 5 minutes à température ambiante
- Aspirer le liquide et réaliser 2 lavages à l'eau stérile
- Aspirer le reste de l'eau stérile et laisser sécher pendant 2 h à température ambiante

Ensemencement

- Après trypsination des cellules, réaliser un comptage automatique au bleu de trypan
- Ensemencer sur lamelles dans une plaque 24 puits ou 4 puits 4×10^4 cellules dans un volume final de 500 µL
- Incuber les cellules à 37°C sous atmosphère humide avec 5% de CO₂ pendant 1 nuit

Marquage EdU

- Diluer le composant A (solution stock à 10mM) pour obtenir 20 µM dans du milieu de culture
- Préchauffer le composant A dilué
- Aspirer la moitié du volume du milieu de culture des cellules
- Ajouter l'équivalent de cette moitié en composant A dilué afin d'obtenir une concentration finale de 10 µM dans chaque puit
- Incuber 2 h à 37°C sous atmosphère humide avec 5% de CO₂

Fixation au paraformaldéhyde (PFA) et perméabilisation des membranes

- Aspirer le milieu de culture et réaliser 3 lavages rapide au PBS 1x stérile
- Sous une hotte chimique, déposer 200 µL de PFA 4% (Sigma Aldrich, 818715) dans chaque puits et laisser incuber 10 minutes à température ambiante
- Réaliser ensuite 3 lavages de 5 minutes dans un mélange BSA 3% + PBS 1x
- Déposer 200 µL d'une solution de Triton 0,1% (Pharmacia Biotech 100x) dans chaque puits et laisser incuber 10 minutes à température ambiante
- Réaliser 3 lavages de 5 minutes dans un mélange BSA 3% + PBS 1x

Détection EdU

- Diluer au 1/1000 le 1x Click-iT buffer additive dans de l'eau distillée
- Réaliser le mélange réactionnel Click-iT reaction cocktails (*cf Figure 89*)

Reaction components*	Number of coverslips						
	1	2	4	5	10	25	50
1X Click-iT® reaction buffer (prepared in step 1.4)	430 µL	860 µL	1.8 mL	2.2 mL	4.3 mL	10.7 mL	21.4 mL
CuSO ₄ (Component E)	20 µL	40 µL	80 µL	100 µL	200 µL	500 µL	1 mL
Alexa Fluor® azide (prepared in step 1.3)	1.2 µL	2.5 µL	5 µL	6 µL	12.5 µL	31 µL	62 µL
Reaction buffer additive (prepared in step 4.1)	50 µL	100 µL	200 µL	250 µL	500 µL	1.25 mL	2.5 mL
Total volume	500 µL	1 mL	2 mL	2.5 mL	5 mL	12.5 mL	25 mL

***Note:** Add the ingredients in the order listed in the table.

Figure 90 : Mélange réactionnel du kit EdU Click-iT.

- Incuber le mélange sur les lamelles 30 minutes à température ambiante à l'abri de la lumière
- Réaliser 1 lavage de 5 minutes dans un mélange BSA 3% + PBS 1x

Blocage

- Préparer la solution de blocage dans du PBS 1x avec 5% de BSA (BSA, Euromedex, ref : 04-100-810C) et 5% de SVF (SVF, Sigma Aldrich, ref : P30-3306).
- Déposer 200 µL par puits de solution de blocage et laisser incuber 1 h à température ambiante sous légère agitation

Incubation des anticorps primaires

- Préparer la solution d'anticorps primaire à la dilution souhaitée dans le tampon de blocage (cf [tableau 15](#))
- Déposer 200 µL de la solution dans chaque puits et laisser incuber 1 nuit à 4°C sous agitation lente

Lavages et incubation des anticorps secondaires (à l'abri de la lumière)

- Réaliser 3 lavages de 5 minutes au PBS 1x à température ambiante
- Préparer une solution d'anticorps secondaires à la dilution souhaitée (1/1000) dans le tampon de blocage (cf [tableau 15](#))
- Déposer 200 µL par puits de solution d'anticorps secondaire et laisser incuber 1 h à température ambiante sous légère agitation

Lavages, coloration des noyaux et montage des lames (à l'abri de la lumière)

- Réaliser 3 lavages de 5 minutes au PBS 1x à température ambiante
- Diluer le composant G au 1/2000 dans du PBS 1x pour les T- et diluer le DAPI au 1/5000 dans de l'eau milliQ comme décrit précédemment
- Déposer 200 µL de solution dans chaque puits et laisser incuber 30 minutes à température ambiante sous légère agitation
- Réaliser 2 lavages de 5 minutes au PBS 1x puis 1 lavage de 5 minutes à l'eau milliQ à température ambiante

- Sur des lames annotées, déposer une goutte de liquide de montage (Invitrogen, ref : 00-4958-02)
- Egoutter rapidement la lamelle et venir la déposer face retournée sur le liquide de montage
- Eliminer les bulles formées entre la lame et la lamelle
- Laisser sécher à l'horizontale, 1 h à température ambiante puis 1 nuit à 4°C
- Réaliser la prise d'image au microscope confocal Nikon C2

Fiche 18 : Mesure du taux de viabilité par MTT

Ensemencement

- Après trypsination des cellules, réaliser un comptage automatique au bleu de trypan
- Ensemencer dans une plaque 12 puits ou 4 puits 4×10^4 cellules dans un volume final de 2 mL
- Incuber les cellules à 37°C sous atmosphère humide avec 5% de CO₂ pendant 1 nuit

Traitement

- Diluer le SRT2104 (CliniSciences, ref : orb315495) dans du milieu de culture pour obtenir 1 µM final
- Aspirer le milieu de culture des puits et ajouter le traitement ou remettre du nouveau milieu de culture pour les puits non-traités
- Incuber les cellules à 37°C sous atmosphère humide avec 5% de CO₂ pendant 72 heures

MTT assay

- Préparer la solution de MTT (Invitrogen, ref : M6494) à une concentration de 5 mg/mL dans une solution de PBS 1x enrichie avec 4,5 mg/mL de glucose
- Aspirer le milieu et laver le tapis cellulaire avec du PBS 1x
- Déposer 200 µL de la solution de MTT et ajouter 2 mL de milieu de culture
- Incuber les cellules à 37°C sous atmosphère humide avec 5% de CO₂ pendant 3 heures
- Aspirer délicatement la solution de MTT sans aspirer les cristaux
- Ajouter 100 µL de DMSO et laisser dissoudre en agitant délicatement
- Mesurer l'absorbance à 570 nm et à 690 nm

Annexes

**Methionine synthase interacts with MAT α 2 and DNMT3b in the nucleus:
evidence of nuclear methionine cycle**

Manon Jeandel ¹, Jean-Marc Alberto ¹, Okan Baspinar ¹, Aurélie Robert ¹, Natacha Dreumont ¹, Zeinab Alsahly ¹, François Feillet ^{1,2}, David Meyre ^{1,3}, Jean-Louis Guéant ^{1,2,3,¶}, David Coelho ^{1,2,¶,*}

^a University of Lorraine, Inserm, UMRS 1256, NGERE – Nutrition, Genetics, and Environmental Risk Exposure, F-54000 Nancy, France.

^b University of Lorraine, University Hospital of Nancy (CHRU), National Center and Reference Laboratory of Inborn Errors of Metabolism, F-54000 Nancy, France.

^c Department of Molecular Medicine, Division of Biochemistry, Molecular Biology, and Nutrition, University Hospital of Nancy, F-54000 Nancy, France.

[¶] The last two authors contributed equally to this work

* Correspondance to: David Coelho, Inserm-UL U1256 – NGERE, Faculté de Médecine, Bâtiment C 2ème étage, 9 Avenue de la Forêt de Haye, BP20199, 54505 Vandœuvre-lès-Nancy, France. Telephone: +33 (0)3 72 74 61 50; E-mail: david.coelho@inserm.fr

Abstract

Transmethylation reactions, which are crucial for the regulation of gene expression, require S-adenosyl-L-methionine (SAM) as methyl donor. The substrate for SAM synthesis is methionine, which can be produced by methionine synthase (MS) in one-carbon metabolism (1-CM). Alterations of 1-CM are associated with epigenetic alterations, despite the presence of methionine in the milieu, suggesting a preferential use of the methionine produced de novo. This highlights the crucial role of MS activity and would imply for nuclear transmethylation reactions, nuclear import of SAM or MS nuclear localization allowing protein-protein interactions with the MAT enzymes responsible for SAM production. Here, we provide the experimental evidence of MS localization and activity in the nucleus where it interacts with MAT α 2, the catalytic subunit of MATII, and the methyltransferase DNMT3b. We also detected all the other enzymes and metabolites of the methionine cycle in the nucleus. These results support the idea that spatial compartmentalization of 1-CM could play a major role in regulating the epigenome.

Keywords: methionine synthase, methionine adenosyl-transferase, DNA methyltransferase, compartmentalization, one-carbon metabolism, cobalamin deficiency.

Teaser

This study opens new perspectives in the understanding of epigenomic modifications involved in the regulation of gene expression.

1. Introduction

Regulation of gene expression involves epigenetic modifications that mainly occur in the nucleus or mitochondria for mitochondrial genes (1). This process requires the dynamic coordination of different regulatory factors compartmentalized within the nuclei (2). Methylation of histones and nucleic acids requires the presence of S-adenosyl-L-methionine (SAM) as the methyl group donor (3). SAM is synthesized by methionine adenosyl-transferases (MAT) by transferring of the adenosyl group of ATP to methionine during the methionine cycle. Transmethylation reactions also produce S-adenosyl-homocysteine (SAH) that is further hydrolyzed by adenosyl-homocysteinase (AHCY) to adenosine and homocysteine, which in turn can be degraded in the transsulfuration pathway, *via* the cystathionine β -synthase (CBS), or re-methylated by the ubiquitously expressed methionine synthase (MS) encoded by *MTR*. The reaction catalyzed by MS requires the methyl group from 5-methyl-tetrahydrofolate (5-methyl-THF) and vitamin B12, also named cobalamin (Cbl), as cofactor. Thus, MS acts at the crossroads between the folate and the methionine cycles in the one-carbon metabolism (1-CM) (4,5). Alternatively, homocysteine re-methylation can be catalyzed by betaine-homocysteine S-methyltransferase (BHMT), which is primarily expressed in the liver and kidney.

The methionine cycle is described as strictly cytosolic, except in some yeasts, in which it is restricted to the nucleus (6). Several enzymes involved in this pathway, BHMT, MAT isozymes, AHCY, and CBS, have been described in the nuclei, suggesting that the BHMT-dependent methionine cycle could occur in the nuclei of cells expressing BHMT (7–11). However, there is no indication that the MS-dependent canonical methionine cycle could occur in the nuclei of higher eukaryotes.

Nutritional deficit of folate or vitamin B12, or genetic defects of the intracellular metabolism of cobalamin can result in decreased MS activity, leading to the accumulation of homocysteine and the decrease of SAM/SAH ratio (12). However, methionine, the substrate required for SAM synthesis, is not only produced by homocysteine re-methylation but is also provided by diet and protein catabolism (13). Experimental results in MS-deficient cells and animal models have shown a reduction in SAM synthesis despite the presence of methionine in the cell medium or the animals' diet. These observations raise the question of cellular methionine 'pools' that could be preferentially used for SAM synthesis. It also strongly suggests that *de novo* methionine synthesis is particularly important for SAM production. This hypothesis is based on various data in the literature which show that the use of methionine for the synthesis of SAM, necessary for transmethylation reactions, or incorporation into protein synthesis differs according to the quantity of methionine available and the origin of this methionine, *i.e.*, dietary intake or homocysteine re-methylation (14,15). Taken together, these data indicate that the partitioning of methionine between its different possible uses – transmethylation and protein synthesis - is a complex process that remains poorly understood. Moreover, it has been shown that under standard dietary conditions, the amount of

methionine synthesized *de novo* by MS represents a minor fraction, approximately 3% of the total cellular methionine pool (16). The importance of MS activity and SAM needs on cellular proliferation and post-replicative DNA methylation also support the idea that SAM and its substrate, methionine, should be present in the nuclear compartment. Impaired activity of MS alters cell proliferation through epigenomic mechanisms in tissues with high proliferative index, such as hematopoietic and epithelial cells, with clinical consequences such as megaloblastic anemia, glossitis and intestinal mucosal atrophy (17).

All these recent advances support the concept that the spatial compartmentalization of the methionine cycle, by increasing the local concentration of related enzymes and substrates, could play a major role in the dynamic regulation of the epigenome. Moreover, since several enzymes involved in 1-CM have been localized into the nucleus, the idea that all required metabolites, including methionine, are not necessarily transported from the cytoplasm but produced *in situ* is pertinent. Thus, we hypothesized that the crucial role of methionine synthase activity in SAM synthesis suggests a preferential use of *de novo* produced methionine. The local production of metabolites involved in SAM synthesis would imply a nuclear localization of MS and possibly novel protein-protein interactions. Here, we show that all the enzymes of the methionine cycle, including MS and the related metabolites, are present in the nuclear compartment of HepG2 cells and fibroblasts from control and *cb1G* patients with deficient methionine synthase activity. Our study further revealed that MS is also located in the nucleus, where it is active and where it interacts with MAT α 2 and DNMT3b methyltransferase. Thus, our work uncovers a novel level of spatial compartmentalization of the enzymes involved in the methylation pathway that could allow a substrate channeling between the producers and consumers of the metabolites involved in the methylation reactions.

2. Results

2.1. Methionine synthase and the other enzymes of the methionine cycle are localized in the nucleus

Methionine synthase, the enzyme at the crossroad between folate and methionine cycles, is usually described as strictly cytosolic. Based on the hypothesis that MS could be present in the nucleus, we first explored its subcellular localization by performing immunofluorescent labeling of MS in HepG2 cells, control (WT), *cb1G* patient fibroblasts which are deficient in MS activity but still present a residual enzymatic activity of the enzyme, *cb1C* and *cb1E* fibroblasts which are respectively deficient in MMACHC, the cytoplasmic transporter of cobalamin and in methionine synthase reductase (MSR) which maintains cobalamin in active state. Both types of genetic defects present a decrease in MS enzymatic activity. Our results, visualized by confocal microscopy, indicate a cytoplasmic and a nuclear localization of MS in all cells tested. STAC imaging was performed to confirm the presence of MS in the nucleus ([Figure 1A](#)) ([Supplementary Figure S1A](#)).

Then, we investigated the subcellular localization of methionine adenosyl-transferase (MAT) enzymes, which are responsible for producing SAM, the universal methyl donor group. MAT II enzyme, whose expression is ubiquitous in the organism, is formed by the catalytic subunit MAT α 2 and the regulatory subunit MAT β . We visualized by confocal microscopy an immunofluorescence staining of MAT α 2 in HepG2 cells, control (WT), and *cb1G* fibroblasts. Similarly, our results show that MAT α 2 is present in the cytoplasm and also in the nucleus of all cell lines (*Figure 1B*) (Supplementary Figure S1B). These results are consistent with previous studies that have reported a nuclear localization of MAT α 2 (18).

To further investigate the localization of the enzymes involved in the methionine cycle, we performed immunofluorescent staining of the cells visualized by confocal microscopy with antibodies directed against MAT β , MAT α 1, the catalytic subunit of MAT I and MAT III enzymes (that are only expressed in the liver), and MSR. We also find cytoplasmic and nuclear localization for all these enzymes (*Supplementary Figure S1C - E*). To confirm the subcellular localization of these enzymes, we performed a subcellular fractionation of HepG2 cells, control (WT), and the patient's fibroblasts. The fractionation was realized with HepG2 cells harvested in the exponential phase of proliferation and fibroblasts used at 80% of confluence to obtain enough cells to conduct the following experiments. The purity of the different fractions was assessed with a WES capillary electrophoresis assay against α -tubulin as a cytoplasmic marker and TATA Box Binding Protein (TBP) as nuclear maker. No α -tubulin signal was detected in the nuclear fractions, and no TBP signal was detected in cytoplasmic fractions (*Figure 1C*). Similar results were obtained using *cb1C* and *cb1E* patient cells (*Supplementary Figure S2A*). We then performed immunoblotting of all the enzymes involved in the methionine cycle, including MS, MSR, MTHFR, CBS, AHCY, and MAT subunits in cytoplasmic and nuclear fractions of HepG2 cells, control, and *cb1G* fibroblasts. Our results confirm the nuclear localization of MS, MSR, and MAT subunits observed in our immunofluorescent staining. Therefore, we provide evidence of the nuclear localization of all the enzymes involved in the canonic methionine cycle (*Figure 1D and 1E*). A weak signal was observed for MTHFR in the nuclear fraction of all cell lines tested. Similar results were obtained using *cb1C*, *cb1E* and another *cb1G* cell line (*Supplementary Figure S2B - E*). As expected, we observed a decreased level of MS expression in *cb1G* fibroblasts with pathogenic variants of *MTR* compared to control fibroblasts. In these blots, we observed a low expression of MS in *cb1G* cells, which is consistent with the residual activity required for cell viability, including in the nuclear fraction. The expression levels of MS are similar in both subcellular fractions. Furthermore, we did not observe a significant difference in nuclear MS level between *cb1G* and WT fibroblasts. This result suggests a potential adaptative mechanism to maintain methylation levels in the nucleus. Two bands can be visualized in MS immunoblot corresponding to the two MS splice variants that are usually expressed according to the proliferation status of the cells, one active form at 144 kDa and one inactive truncated form at 124 kDa (*Figure 1D*). The expression of the active MS is associated with proliferating cells, while the expression of the inactive MS form is predominant in cells in stationary phase (19). To investigate whether the subcellular localization of MS could differ according to the

proliferation status of the cells, we performed immunofluorescent staining of MS using cells incubated with EdU. We did not detect any difference in MS staining between EdU-labelled cells and non-labelled, suggesting that cellular cycle status does not influence MS subcellular localization (*Supplementary Figure S1F*). Finally, to further confirm the nuclear localization of MS with a technique that eliminates the need for antibodies and the specificity bias they can generate to visualize the protein, we produced a plasmid coding for the two isoforms of methionine synthase fused with green fluorescent protein (MS-GFP). We transfected HEK293T cells, which are cells easily transfected, unlike HepG2 cells and fibroblasts, with our plasmids and visualized the cells by confocal microscopy and STAC imaging (*Figure 1F*). Once again, our results confirmed the dual localization of both MS isoforms in the cytoplasm and nucleus.

2.2. All the metabolites of the methionine cycle are present in the nucleus

Since the presence of MS in the nucleus would imply a functional methionine cycle in this subcellular compartment, we studied the metabolites of the methionine cycle by LC/MS-MS in subcellular fractions of HepG2 cells, control fibroblasts (WT), and *cb1G* fibroblasts (*Figure 2*). We detected methionine both in the cytoplasm, as expected, but also in the nuclear fractions at the same order of magnitude. We did not observe any significant difference in the concentration of methionine between *cb1G* and control (WT) fibroblasts in both subcellular fractions since the cell culture was performed in the presence of methionine in the cellular medium. Thus, the methionine observed in *cb1G* fibroblasts that are deficient in MS but still have residual enzymatic activity is likely the result of exogenous methionine and a minor contribution of residual MS (*Figure 2A*). This result is consistent with the data obtained with the MS immunofluorescence staining and the immunoblotting assays performed with the nuclear fraction in *cb1G* fibroblasts. We detected SAM and SAH in the nuclear fractions of all cell lines, and we did not see a significant difference in SAM levels in the cytoplasmic and the nuclear fractions of *cb1G* compared to WT fibroblasts (*Figure 2B*). Nevertheless, we can notice that the SAM level in the nucleus is much lower than in the cytoplasm. SAH levels were significantly decreased in the cytoplasmic fractions of *cb1G* fibroblasts compared to the control ($p < 0.001$) but not in the nuclear fraction (*Figure 2C*). Furthermore, the SAH level was approximately four times lower in the nucleus than in the cytoplasm. We observed an increase in the SAM/SAH methylation index in *cb1G* fibroblasts compared to control cells ($p < 0.01$). However, we did not detect any significant difference in the SAM/SAH ratio in the nuclear fractions of these two cell lines (*Figure 2G*). Similarly, homocysteine levels were not significantly different between *cb1G* and WT cells in both subcellular fractions (*Figure 2D*). Nevertheless, homocysteine concentration was much higher in the cytoplasmic fractions than in the nuclear fractions. In addition, we detected cystathionine (CTH) in the nuclear fractions of all cell lines in agreement with previous studies that described a nuclear localization of CBS (*Figure 2E*). Given that we found that MTHFR, the enzyme responsible for the synthesis of 5-methyl-THF, is also present in the nucleus, we explored the level of this metabolite in both subcellular fractions. Consistently, we detect 5-methyl-THF in the nucleus of all cell lines at a concentration approximately 50 times lower than in the cytoplasm, with no significant

difference between *cb1G* and control fibroblasts (*Figure 2F*). Collectively, these results highlight the presence of all intermediate metabolites of the methionine cycle in the nuclear fractions of HepG2, control, and *cb1G* fibroblasts, with a maintained concentration of metabolites in the nuclei of *cb1G* cells.

2.3. Methionine synthase is active in the nucleus

To further confirm that our MS staining reflects the presence of an active enzyme in the nucleus, we measured the MS enzymatic activity in cytosolic and nuclear fractions of HepG2 cells and control fibroblast (WT). Both fractions were incubated with 5-methyl-tetrahydrofolate radiolabeled with ^{14}C in the methyl group (5- ^{14}C -methyl-THF) (*Figure 3D*). Samples were recovered after 20, 40, and 60 minutes of incubation to realize an *in vitro* kinetic of enzymatic activity. Our results clearly reveal the presence of ^{14}C -methionine in the nuclear fractions of HepG2 cells and WT fibroblasts, demonstrating the presence of active MS in the nucleus. Furthermore, the kinetic enzymatic activity analysis indicated that this activity increased in time, as observed in whole-cell extracts (*Figure 3A and B*). Finally, the comparable production of ^{14}C -methionine in the cytoplasmic and in the nuclear fraction after 1-hour incubation with 5- ^{14}C -methyl-THF indicate that MS activity was in the same order of magnitude in the nuclear and cytoplasmic fractions (*Figure 3C*).

2.4. Methionine synthase interacts with MAT subunit

The presence of MS in the nucleus suggests that a nuclear synthesis of methionine could be useful for the synthesis of SAM by providing it locally as a substrate of MAT enzymes. We next hypothesized that MS could interact with MAT subunits. Three different MAT enzymes are encoded by three genes in humans. MAT I and MAT III enzymes are formed respectively by a dimer or a tetramer of the MAT α 1 catalytic subunit encoded by the *MAT1A* gene, which is only expressed in the liver. MAT II enzyme is ubiquitously expressed and is formed by a dimer of the catalytic subunit MAT α 2 encoded by *MAT2A* and a regulatory subunit MAT β encoded by *MAT2B*. Whole protein extract, cytoplasmic fractions, and nuclear fractions of HepG2 cells, control (WT), and *cb1G* fibroblasts were submitted to a series of systematic immunoprecipitations and corresponding western blots using antibodies directed against MS, MAT α 1, MAT α 2, and MAT β . First, an immunoprecipitation of MS and a western blot with another antibody against MS was performed to confirm the correct protein immunoprecipitation (*Figure 4A*) (*Supplementary Figure S3A*). The absence of MS in the input samples of the nuclear fractions of HepG2 cells and control fibroblasts indicated a very low amount of MS in the nucleus. The immunoprecipitation of MS followed by a western blot against the same protein amplified the signal obtained in the nuclear fractions. Further, it confirmed the presence of MS in the nucleus.

Then, immunoprecipitated samples with anti-MS antibody were subjected to different western blots against MAT subunits (*Figure 4B*) (*Supplementary Figure S3B*). Our results clearly confirmed the dual localization, cytosolic and nuclear, of MS and MAT α 2 and reveal a novel

interaction in both subcellular compartments between MS and the catalytic subunit MAT α 2 by immunoprecipitation of MS and western blot against MAT α 2. Similarly, total protein extract, cytoplasmic fractions, and nuclear fractions were immunoprecipitated with anti-MAT α 2 antibody and subjected to western blot for MAT α 2 and MS to confirm their interaction. Our results confirm the interaction between MS and MAT α 2 in both subcellular compartments (*Figure 4C and D*). Similar results were obtained using *cbIG* fibroblasts (*Supplementary Figure S3C and D*). Immunoblotting of MAT β and MAT α 1 performed on MS-immunoprecipitated samples does not show any interaction between MS and MAT α 1 or between MS and MAT β in HepG2 cells, WT, *cbIG*, *cbIC*, and *cbIE* fibroblasts (*Supplementary Figure S3E and F*).

We performed a Duolink[®] Proximity Ligation Assay to confirm the novel interaction between MAT α 2 and MS and its subcellular localization. Experiments were performed in control (WT) and *cbIG* fibroblasts using antibodies against MS and MAT α 2. Positive signals are obtained in all cell lines, thus confirming interactions between these two proteins, both in the cytoplasm and in the nucleus (*Figure 4E*). Then, we studied the consequence of *MTR* mutations on the interaction with MAT α 2 by measuring the interactions in a *cbIG* cell line carrying *MTR* mutations *in situ*. Our results showed that the impaired MS expression resulted in a significant decrease in the interaction with MAT α 2 in the cytoplasm of *cbIG* fibroblasts ($p < 0.001$) (*Figure 4F and G*). These results confirm the specificity of the anti-MS antibody we used in our experiments.

2.5. Methionine synthase and MAT α 2 interact with the DNA methyltransferase DNMT3b

Our results strongly suggest that MAT α 2 synthesizes SAM by preferentially using the methionine synthesized by MS as substrate. To further dissect the role of the nuclear interaction between MS and MAT α 2, we investigated their potential interaction with a methyltransferase. Thus, we hypothesized that MS and MAT α 2 could interact with an enzyme that uses SAM to methylate nuclear targets such as DNA and histones.

We subjected whole cellular, cytoplasmic, and nuclear fractions of HepG2 cells, control (WT), and *cbIG* fibroblasts to an immunoprecipitation of MS followed by a western blot with another antibody against MS to confirm the proper immunoprecipitation of the protein (*Figure 5A*). We further investigated the potential interaction between MS and the DNMT3b methyltransferase, which catalyzes the *de novo* methylation of DNA, and DNMT1, the DNA methyltransferase needed for maintaining the post-replicative methylation pattern of DNA. The co-immunoprecipitation of MS followed by a western blot against DNMT1 in total protein extract, cytoplasmic, and nuclear fractions did not evidence any MS interaction with DNMT1 (*Supplementary Figure S4*). Then, immunoprecipitated samples with MS antibody were subjected to a western blot against DNMT3b. Our results reveal a novel interaction between MS and DNMT3b in total protein extracts and in cytoplasmic and nuclear fractions (20,21) (*Figure 5B*).

We then investigated the interaction between MAT α 2 and DNMT3b. Total protein extracts, cytoplasmic fractions, and nuclear fractions were immunoprecipitated with anti-MAT α 2 antibody and subjected to western blot analysis for DNMT3b (*Figure 5C and D*). Our results confirm the nuclear localization of MAT α 2 and indicate that MAT α 2 and DNMT3b interact in the cytoplasmic and nuclear fractions. Altogether, our results suggest that the interaction of MAT α 2 with DNMT3b allows the production of SAM directly where the methyl group is needed for *de novo* methylation of DNA. Furthermore, the interactions between MS and MAT α 2, and between MS and DNMT3b in the nucleus, suggest a substrate channeling of methionine and SAM in the interactome formed by these three enzymes, coupling the methionine cycle to the production of SAM and its use for DNA methylation.

3. Discussion

Here, we show that MS, usually described as strictly cytosolic, is also located in the nucleus of human cells where it interacts with MAT α 2, the catalytic subunit of the MAT II enzyme that produces SAM, and with the DNA methyltransferase DNMT3b that uses SAM to methylate *de novo* DNA. Furthermore, we detect all the enzymes and related metabolites of the methionine cycle in the nuclear compartment, including MTHFR and its catalytic product 5-methyl-THF, the co-substrate of MS. Thus, we propose that a nuclear methionine cycle and these protein-protein interactions could contribute to the efficiency of the methylation reactions involved in the regulation of gene expression by producing locally the metabolites required for the synthesis of SAM.

The presence of all intermediate metabolites of the methionine cycle in the nucleus (*Figure 2*) suggests either the nuclear import of the different enzymes involved in this pathway or the import of metabolites from the cytoplasm to the nucleus (*Figure 1*). While the nuclear membrane is most likely permeable to small molecules, many studies indicate that the metabolic enzymes in the nucleus may influence the regulation of epigenomic modifications, such as histone acetylation, by providing locally the metabolite required for this reaction (22). Subcellular compartmentalization of folate metabolism has already been described with numerous studies highlighting the complex network of interconnected pathways divided into mitochondria, cytoplasm, and nucleus (23). During folate deficiency, nuclear levels of folate remain high following the nuclear translocation of MTHFD1, which can produce methylenetetrahydrofolate from formate (24). Similarly, glycine N-methyltransferase (GNMT) is a cytosolic enzyme that is also imported in the nucleus following folate deficiency (25). While MS expression is lower in the cytoplasm of *cb1G* cells compared to control, we observed in the nuclei of *cb1G* cells similar expression levels of MS and SAM. These data suggest that the nuclear compartmentalization of the methionine cycle can be regulated to protect the nuclear machinery from the consequences of impaired MS activity. This adaptive mechanism is consistent with the absence of modification in global DNA methylation in the brain and eye tissues of transgenic mice with selective MS deficiency despite the global decrease of SAM concentration (26). Prior studies have demonstrated that several enzymes involved in the

methionine cycle can be found in the nucleus. The presence of MAT enzymes in the nucleus has been described in several cell types (27). Since transmethylation reactions produce SAH, a potent inhibitor of methyltransferases, the presence of AHCY, the only enzyme able to hydrolyze SAH to homocysteine and adenosine, is required in all subcellular compartments where transmethylation reactions occur. AHCY has been found in the nuclei of various cell types (7,28–31). Furthermore, CBS, which converts homocysteine to cystathionine, could be present in the nucleus (32). This suggests that the methylation reactions in the nucleus require the presence of 1-CM enzymes to ensure a dynamic control of the needs in SAM. Here, we show that MTHFR is also present in the nuclear fraction. Previous data describing the nuclear localization of the other enzymes of the folate cycle such as DHFR, SHMT1, SHMT2a and TYMS suggest the nuclear production of one-carbon precursors of methyl groups (33). In addition to the presence of MS co-substrate, our finding that MS and MSR are present in the nuclear compartment supports the idea that the whole methionine cycle can occur within the nucleus.

We analyzed the sequence of the *MTR* gene using different prediction software, and we did not find any known nuclear localization signal (NLS). Usually, proteins with a molecular mass higher than 40 kDa require a NLS to translocate into the nucleus (34). However, nuclear translocation of BHMT, MTHFD1 and GNMT occurs despite the absence of a consensus sequence for nuclear localization (35). Furthermore, we investigated *in silico* the potential interactions between MS and other proteins using different databases (FpClass, BioGRID, BioPlex, etc.). These databases suggest that 59 proteins could interact with MS, including 33 exclusively nuclear proteins, including a putative methyltransferase (NSUN5P1) and a protein involved in the reorganization of chromatin and regulation of H3K26 methylation (RCCD1). This finding is consistent with our results, indicating a nuclear localization of MS. Since our study did not investigate the molecular mechanisms responsible for the translocation of MS in the nucleus, a detailed proteomics analysis of subcellular fractions could to be performed to address this question, including detailed studies about the components of the nucleopore and their post-translational modifications. Finally, even if we did not detect any difference in MS localization according to the proliferation status of the cells used, the hypothesis of a dynamic regulation of the nuclear subcellular localization of MS according to the nucleus needs should be tested.

Our hypothesis of preferential use of the methionine synthesized *de novo* for the production of SAM suggested a close interaction between MS and one of the MAT enzymes. Here, we show that MS can interact with MAT α 2 in the cytoplasm and the nucleus (*Figure 4*). Although the crucial role of histones and DNA methylation in epigenomic processes is well described, understanding how SAM is provided to nuclear methyltransferases is less documented. Several studies have shown that the nuclear localization of MAT enzymes and protein-protein interactions with methyltransferases contribute to regulate gene expression by providing SAM locally to nuclear enzymes (36). For instance, a multi-protein complex SAM-integrating transcription repression (SAMIT) was proposed to include MAT to produce SAM locally to repress gene transcription through DNA methylation (27,37). The interaction between the

SAMIT and methyltransferases (MT) suggests that SAM synthesis can be directly coupled to the methylation of target proteins or DNA (27). Another interaction between MAT α 2 and a nuclear methyltransferase was reported with the H3K9 methyltransferase SETDB1 to regulate *Ptgs2* expression (38). Since MAT α 2 has already been described in the nucleus to interact with various methyltransferases, we postulated that MS could also interact with a MT, and our results confirmed this hypothesis by showing that MS, MAT α 2, DNMT3b interact within the nucleus (*Figure 5*). Here, we investigated the interaction between MS and a DNA methyltransferase, but further experiments will be required to investigate the interactions between MS and histone methyltransferases, including SETDB1, which interacts with MAT α 2. Further experiments will also be needed to characterize the interaction between MS and DNMT3b and investigate whether MAT α 2 is required. While we provide experimental evidence of MS activity in the nuclear fraction associated with protein-protein interactions between the producer and a user of SAM, we do not demonstrate that the methionine synthesized *de novo* in the nucleus is directly used for the local synthesis of SAM.

Overall, by providing the experimental evidence of a nuclear methionine cycle, and by showing that MS could interact not only with MAT α 2 but also with DNMT3b, our results highlight the crucial role of MS in the methylation pathway and the spatial compartmentalization of the methionine cycle. Thus, our study opens new perspectives in the understanding of epigenomic modifications involved in the regulation of gene expression.

4. Methods

4.1. Cell lines and culture conditions

Patient's fibroblasts were provided by the McGill University in Canada (D.R. Rosenblatt; *cbIG* 2), the University Hospital of Zurich in Switzerland (M.R. Baumgartner; *cbIG* 1), and the National Reference Laboratory (LBMR) of Inborn Errors of Metabolism in the CHRU Hospital of Nancy in France (*cbIC* and *cbIE*). HepG2 cells (HB-8065), HEK293T cells (ACS-4500) and control fibroblasts (PCS-201-010) were purchased from LGC Standards (Teddington, United Kingdom). Fibroblasts were grown in Dulbecco's Modified Eagle Medium high glucose (DMEM, Sigma Aldrich D6429) containing 0,03 g/L of methionine supplemented with 10% fetal calf serum (v/v) (Sigma Aldrich P30-3306), 1% sodium pyruvate (100 mM) (Gibco S8636) and 1% (100 U) penicillin-streptomycin (v/v) (Gibco P4333). The medium was changed twice a week until the cells reached 80% confluence. All cells have been used with a similar number of passages between 10 and 21. HepG2 cells and HEK293T cells were grown in Dulbecco's modified Eagle medium high glucose (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) (v/v) and 1% (100 U) penicillin-streptomycin (v/v) (Gibco). Cells were trypsinized (Trypsin-EDTA, Sigma Aldrich T3924) every 4 days to harvest cells in the exponential proliferation phase. All cell lines were cultured at 37°C with 5% CO₂ and were tested (Polymerase Chain Reaction: PCR) negative for mycoplasma contamination.

4.2. Preparation of separate nuclear and cytoplasmic fractions, protein total extraction, and dosage of protein quantity

Nuclear and cytoplasmic fractions were separated using NE-PER® kit (Thermo Fisher Scientific; ref 78833), which was used according to the manufacturer's instructions.

For total protein extraction, cellular pellets were extracted in a lysis buffer (NaCl, Tris pH8, IGEPAL, EDTA pH8) supplemented with 10% Protease Inhibitor Cocktail (PIC) (Roche, Boulogne-Billancourt, France, P8340), 10% phenylmethylsulphonyl fluoride, 10% sodium orthovanadate and 50% NaBu. After 30 minutes of incubation and 12,000 g centrifugation maintained at 4°C for 10 minutes, the supernatant was collected. The protein extract was dosed with the BCA assay method (Pierce, Brebieres, France, UP40840A) using BSA as standard protein.

4.3. Immunoprecipitation

Whole-cell lysates and cytoplasmic and nuclear fractions were prepared to obtain 500 µg of proteins in each sample. The different lysates were incubated with 5 µL of Dynabeads™ Protein G (Thermo Fisher Scientific, ref 10004D) for 20 minutes. After that, each lysate was collected and incubated with 5 µL of antibody of interest (MS ref: 25896-1-AP; MATα2 ref: NB110-94158) for 1h. The lysates were retrieved and incubated with 25 µL of Dynabeads™ Protein G at 4°C overnight. Samples were recovered and washed four times with 1x PBS. Fifty microliters of 1% SDS (Sigma Aldrich L4509) were added with 12 µL of 5x Laemmli buffer. After heating at 95°C for 3 minutes, the samples were collected and loaded onto SDS-PAGE gel for electrophoresis separation.

4.4. Western blotting

After immunoprecipitation, the totality of the immunoprecipitated total protein, cytoplasmic, and nuclear fractions were loaded per lane for SDS-PAGE migration. Depending on the protein's molecular mass, the stacking and the separating gel contained 6-12% of polyacrylamide, respectively. Proteins were electrotransferred onto PVDF or nitrocellulose membranes (Millipore, Molsheim, France) in Tris buffer containing 39 mM glycine, 0.01% SDS and 20% (vol/vol) absolute ethanol. At room temperature, the membranes were blocked either with 5% non-fat milk or 5% BSA for 1h. The membranes were then incubated at 4°C overnight with various primary antibodies, rabbit anti-MS (1:1000, Abcam, ab66039), rabbit anti-MSR (1:1000, Abcam, ab129159), mouse anti-MATα1 (1:1000, ProteinTech, 67408-1-AG), rabbit anti-MATα2 (1:1000, Novus, NB110-94158), rabbit anti-MATβ (1:1000, Novus, NBP1-82797), rabbit anti-DNMT3b (1:1000, Novus, NB300-516), mouse anti-MTHFR (1:1000, Novus, H00004524-M03), rabbit anti-AHCY (1:1000, ProteinTech, 10757-2-AP) and rabbit anti-CBS (1:1000, Abcam, ab135626). Appropriate secondary antibodies conjugated to HRP (anti-rabbit-HRP 711-035-125 and anti-mouse-HRP 705-035-147, Jackson ImmunoResearch) were used for detection with ECL (Amersham, Velizy-Villacoublay, France, RPN2236) in iBriqt™ (ThermoFisher Scientific).

4.5. Immunofluorescence

Fibroblasts of patients and HepG2 cells (4×10^6 cells) were grown on slides for 24 h and were rinsed two times with 1x PBS (10x D-PBS, Sigma Aldrich 1408). Then, they were fixed with 4% paraformaldehyde (Sigma Aldrich 818715) for 10 min, permeabilized with 1x PBS 0.01% Triton (Pharmacia Biotech HFN10) for 10 min and blocked with 5% of BSA and 5% of FCS for 1 h. Cells were incubated with various primary antibodies, rabbit anti-MS (1:200, ProteinTech, 25896-1-AP), rabbit anti-MSR (1:100, Abcam, ab235354), mouse anti-MAT α 1 (1:200, ProteinTech, 67408-1-AG), rabbit anti-MAT α 2 (1:200, Novus, NB110-94158), mouse anti-MAT α 2 (1:100, Novus, NBP1-28605) and rabbit anti-MAT β (1:200, ProteinTech, 15952-1-AP) overnight in a humid chamber at 4°C under a gentle checking. Slides were washed three times in 1x PBS for 5 min, then incubated with the secondary antibody (Alexa Fluor™ anti-rabbit 488 A11008 and anti-mouse 594 A11005, Jackson ImmunoResearch) for 1 h at room temperature under gentle checking. The nuclei were detected with the fluorescent dye 4, 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (0.43 mg/ml in PBS; Sigma, Lyon, France). Finally, slides were washed four times in 1x PBS and mounted using a mounting medium (Fluoromount-G™ Carlsbad, CA, USA). The immunostained cells were imaged using a Nikon C2 with three laser lines (405, 488 and 543 nm). The images were obtained with x60 oil immersion lens (NIS Elements, Nikon Instruments Inc).

4.6. Duolink Proximity Ligation Assay

This technique is based on the proximity of two proteins. A distance lower than 40 nm results in a red blob that can be visualized by confocal microscopy. The proximity ligation assay (PLA; Duolink *in situ* PLA reagents; Olink Bioscience; Eurogentec, Anger, France, DUO92007-100RXN) was performed to visualize and quantify interactions according to the manufacturer's instructions. After growing fibroblasts and fixed them with 4% paraformaldehyde for 10 min, permeabilized with 1x PBS 0.01% Triton for 10 min and blocked with blocking reagent of kit for 1 h, they were incubated with various primary antibodies, rabbit anti-MS (1:200, ProteinTech, 25896-1-AP) and mouse anti-MAT α 2 (1:100, Novus, NBP1-28605) overnight in a humid chamber at 4°C under a gentle checking. A pair of oligonucleotide-labeled secondary antibodies (PLA probes) was used according to the manufacturer's instructions to bind to the primary antibodies. The PLA signal was assigned using a Nikon C2 confocal microscope. Detection of the nucleus was done with the fluorescent dye 4, 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (0.43 mg/ml in PBS; Sigma, Lyon, France) and the cytoplasm was done with the fluorescent dye phalloidin (1:150 in water, Invitrogen, Phalloidin AlexaFluor™ 488, ref: A12379). Finally, slides were washed four times in 1x PBS and mounted using a mounting medium (Fluoromount-G™ Carlsbad, CA, USA). The images were obtained with an x60 oil immersion lens (NIS Elements, Nikon Instruments Inc). Red blobs were counted with BlopFinder software.

4.7. EdU Click-iT

The EdU Click-iT™ (ThermoFisher Scientific, ref: C10338) was used to study proliferation. In this dosage, EdU, an analog of thymidine modified has incorporated in the DNA during the replication and labelled by fluorescence. Fibroblasts of patients and HepG2 cells were grown on slides for 24 h. The component A was diluted in culture medium and added in cultured cells at 10 µmol/L, and cells were incubated 2 hours at 37°C with 5% of CO₂. After that, cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 10 min and permeabilized with 1x PBS 0.01% Triton for 10 min. The 1x Click-iT buffer additive is prepared according to the recommendation of the manufacturer in deionized water (1:1000) and incubated in cells for 30 minutes at room temperature in the dark. After 1 wash in 1x PBS, cells were blocked with 5% of BSA and 5% of FCS for 1 h, and we realized the immunofluorescence staining of MS as it is described previously. Finally, slides were washed four times in 1x PBS and mounted using a mounting medium (Fluoromount-G™ Carlsbad, CA, USA). The images were obtained with x60 oil immersion lens (NIS Elements, Nikon Instruments Inc).

4.8. Methionine synthase activity: MeTHF labeling with ¹⁴C

Determination of MS activity was performed by modifying the radioisotope assay described by Chen (39). In brief, cell lysates were homogenized at 4°C in 0.5 ml of 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.2) in the presence of protease inhibitors. After centrifugation (20,000 g, 4°C) for 20 minutes to remove cell debris, the supernatant was used as a crude extract. Cytoplasmic and nuclear fractions, prepared as previously described, were used in this experiment. For measurement of holoenzyme activity, the reaction mixture contained 250 mM DL-homocysteine, 25 mM dithiothreitol, 0.05 mM S-adenosyl-methionine, 50 µM of hydroxocobalamin, 1 µCi (50 µM) 5-[¹⁴C]-methyl-THF (PerkinElmer NEC846), crude extract and 0.1 M potassium phosphate buffer in a total volume of 100 µl. The enzyme reaction was carried out under a N₂ atmosphere at 37°C for 20, 40, and 60 minutes in the dark and then stopped by heating at 95°C for 5 minutes. The assay measures the radioactive methionine formed from 5-[¹⁴C]-methyl-THF and homocysteine. The mixture was passed through AG-1X8 (Cl-) columns (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) and ¹⁴C radioactivity in the methionine-containing fraction was measured. The radiolabeled methionine was measured in a Packard liquid scintillation counter. Enzyme activity was expressed as nmoles of methionine produced per hour per mg of protein.

4.9. Capillary western blot (Wes) analyses

According to the manufacturer's instructions, capillary electrophoresis analyses were performed using the ProteinSimple Wes System (ProteinSimple, San Jose, CA, USA). The cytoplasmic and nuclear fractions were mixed with Sample Western Sample Buffer and standards (containing 5 × sample buffer, 5 × fluorescent standard, and 200 mM DTT) to a final concentration of 0.2 µg/µL, reduced and denatured at 95°C for 5 min. After this denaturation step, the prepared samples, blocking reagent, primary antibodies (1:25 dilution for TPB ref:

ab63766, and 1:50 dilution for α -tubulin ref: 2144-S), HRP-conjugated secondary antibodies (anti rabbit detection module ref: DM-001; anti-mouse detection module ref: DM-002 ; Bio-Techne) and chemiluminescent substrate were dispensed into designated wells in an assay plate. After plate loading, the separation electrophoresis and immunodetection steps took place in the fully automated capillary system (Compass for SW, Bio-Techne).

4.10. LC/MS-MS analysis

Nuclear pellets were solubilized in 1x PBS using mechanical grinding by a 25G needle, followed by an ultrasonic bath for 20 minutes at 4°C. Then, nuclear fractions in 1x PBS and cytoplasmic fractions were centrifuged at 12,000 g for 20 minutes. The supernatant was collected for LCMS/MS analysis. Briefly, the supernatants were mixed with DTT containing internal standards, precipitated by adding cold methanol and maintained on ice for 30 minutes. After decanting, the liquid phase was diluted with 4 volumes of 0.1% formic acid. Analysis of 1-CM intermediates such as methionine, homocysteine, SAM, SAH, cystathionine, and methyl-THF was performed using an HPLC system coupled to ESI-Triple quadrupole mass spectrometer (LCMS 8045, Shimadzu, Kyoto, Japan). The chromatography was realized with a Synergi column Fusion-RP (Phenomenex, 150x4.6 mm, 4 μ m) maintained at 40°C and a 0.5 mL/min flow rate of the mobile phase as a mixture of solvent A (0.1% formic acid in water) and B (0.1% formic acid in acetonitrile). Results were analyzed using Insight software V3.1 (Shimadzu, Kyoto, Japan). Samples with concentrations hovering near the detection limits of the instrumentation were excluded to ensure robust results and guaranty reliable concentration detection well within the detection limit. Finally, the total protein amount was measured using the BCA assay method (Pierce, Brebieres, France) using BSA as standard protein as previously described.

4.11. Plasmid MTR transfection in HEK293 cells

The cDNAs corresponding to MS 144 kDa and MS 124 kDa constructs were generated from the MGC human *MTR* clone (clone Id: 40146647; Horizon) using the CloneAmp HiFi Premix (Takara, ref: 639298) following the manufacturer's recommendation. After that, the PCR products were treated with Cloning enhancer (Takara, ref: 639298). The In-Fusion Cloning (Takara, ref: 639298) kit was used after the treatment according to the manufacturer's recommendation. Plasmids were transfected in stellar cells (Takara, ref: 636763), and bacteria were cultivated in an LB agar medium with kanamycin. Plasmid DNA extraction of was performed with the Plasmid QIAgen Midi prep kit (Qiagen, ref: 12145) according to manufacturer recommendations. Plasmids were transfected in HEK293T cells using Jet Pei (Polyplus, ref: 101000053). The transfection efficiency was determined by immunofluorescence and confocal microscopy, as described previously.

4.12. Quantification and statistical analysis

Western blot band intensities were quantified by densitometry using iBright™ Analysis Software. All errors represent the standard error of the mean (\pm SEM) from at least three

independent experiments except for methionine synthase activity with ^{14}C radiolabeled 5-methyl-THF, where there are only two independent experiments. A two-sided P-value <0.05 , 0.01 , and 0.001 was considered statistically significant, very significant, and highly significant, respectively. Statistical analyses were performed using the software GraphPad Prism8.

CRedit authorship contribution statement

Manon Jeandel: Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Investigation, Writing – review & editing, Visualization. Jean-Marc Alberto: Formal analysis, Investigation. Okan Baspinar: Formal analysis, Investigation. Aurélie Robert: Investigation. Natacha Dreumont: Formal analysis, Methodology, Investigation. Zeinab Alsahly: Investigation. François Feillet: Funding acquisition, Writing – review & editing. David Meyre: Resources, Writing – review & editing. Jean-Louis Guéant: Conceptualization, Resources, Writing – review & editing, Supervision, Project administration. David Coelho: Conceptualization, Resources, Writing – review & editing, Supervision, Project administration.

Declaration of competing interests

The authors declare no competing interests.

Data availability

The authors confirm that all data are available in the main text or the Supplementary materials.

Acknowledgements

We express our sincere gratitude to Prof. Rosa-Maria Guéant-Rodriguez from the University of Lorraine for her constructive comments on the manuscript.

Funding

This work was supported by grants from Biology-Medicine-Health department of the University of Lorraine, from FHU ARRIMAGE, the Minister for Higher Education, Research and Innovation (MESRI). The LC/MS-MS acquisition was co-funded by the European Union through the European Regional Development Fund “FEDER-FSE” Lorraine et Massif des Vosges.

References

1. Moore LD, Le T, Fan G. DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology*. 2013 Jan;38(1):23–38.
2. Boon R, Silveira GG, Mostoslavsky R. Nuclear metabolism and the regulation of the epigenome. *Nat Metab*. 2020 Nov;2(11):1190–203.
3. Grillo MA, Colombatto S. S-adenosylmethionine and its products. *Amino Acids*. 2008 Feb;34(2):187–93.
4. Guéant JL, Namour F, Guéant-Rodriguez RM, Daval JL. Folate and fetal programming: a play in epigenomics? *Trends Endocrinol Metab*. 2013 Jun;24(6):279–89.

5. Werge MP, McCann A, Galsgaard ED, Holst D, Bugge A, Albrechtsen NJW, et al. The Role of the Transsulfuration Pathway in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *J Clin Med*. 2021 Mar 5;10(5):1081.
6. Sahu U, Rajendra VKH, Kapnoor SS, Bhagavat R, Chandra N, Rangarajan PN. Methionine synthase is localized to the nucleus in *Pichia pastoris* and *Candida albicans* and to the cytoplasm in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 2017 Sep 8;292(36):14730–46.
7. Shen W, Gao C, Cueto R, Liu L, Fu H, Shao Y, et al. Homocysteine-methionine cycle is a metabolic sensor system controlling methylation-regulated pathological signaling. *Redox Biol*. 2020 Jan;28:101322.
8. Reytor E, Pérez-Miguelsanz J, Alvarez L, Pérez-Sala D, Pajares MA. Conformational signals in the C-terminal domain of methionine adenosyltransferase I/III determine its nucleocytoplasmic distribution. *FASEB J*. 2009 Oct;23(10):3347–60.
9. Pérez-Miguelsanz J, Vallecillo N, Garrido F, Reytor E, Pérez-Sala D, Pajares MA. Betaine homocysteine S-methyltransferase emerges as a new player of the nuclear methionine cycle. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2017 Jul 1;1864(7):1165–82.
10. Radomski N, Kaufmann C, Dreyer C. Nuclear Accumulation of S-Adenosylhomocysteine Hydrolase in Transcriptionally Active Cells during Development of *Xenopus laevis*. *MBoC*. 1999 Dec;10(12):4283–98.
11. Katoh Y, Ikura T, Hoshikawa Y, Tashiro S, Ito T, Ohta M, et al. Methionine adenosyltransferase II serves as a transcriptional corepressor of Maf oncoprotein. *Mol Cell*. 2011 Mar 4;41(5):554–66.
12. Guéant JL, Elakoum R, Ziegler O, Coelho D, Feigerlova E, Daval JL, et al. Nutritional models of foetal programming and nutrigenomic and epigenomic dysregulations of fatty acid metabolism in the liver and heart. *Pflugers Arch - Eur J Physiol*. 2014 May;466(5):833–50.
13. Kožich V, Stabler S. Lessons Learned from Inherited Metabolic Disorders of Sulfur-Containing Amino Acids Metabolism. *J Nutr*. 2020 Oct 1;150(Suppl 1):2506S-2517S.
14. Robinson JL, Bartlett RK, Harding SV, Randell EW, Brunton JA, Bertolo RF. Dietary methyl donors affect in vivo methionine partitioning between transmethylation and protein synthesis in the neonatal piglet. *Amino Acids*. 2016 Dec;48(12):2821–30.
15. Bauchart-Thevret C, Stoll B, Chacko S, Burrin DG. Sulfur amino acid deficiency upregulates intestinal methionine cycle activity and suppresses epithelial growth in neonatal pigs. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009 Jun;296(6):E1239-1250.
16. Ghergurovich JM, Xu X, Wang JZ, Yang L, Ryseck RP, Wang L, et al. Methionine synthase supports tumour tetrahydrofolate pools. *Nat Metab*. 2021 Nov;3(11):1512–20.

17. Guéant JL, Guéant-Rodriguez RM, Kosgei VJ, Coelho D. Causes and consequences of impaired methionine synthase activity in acquired and inherited disorders of vitamin B₁₂ metabolism. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 2022 Mar 4;57(2):133–55.
18. Katoh Y, Ikura T, Hoshikawa Y, Tashiro S, Ito T, Ohta M, et al. Methionine adenosyltransferase II serves as a transcriptional corepressor of Maf oncoprotein. *Mol Cell*. 2011 Mar 4;41(5):554–66.
19. Fofou-Caillierez MB, Mrabet NT, Chéry C, Dreumont N, Flayac J, Pupavac M, et al. Interaction between methionine synthase isoforms and MMACHC: characterization in cblG-variant, cblG and cblC inherited causes of megaloblastic anaemia. *Hum Mol Genet*. 2013 Nov 15;22(22):4591–601.
20. Ko YG, Nishino K, Hattori N, Arai Y, Tanaka S, Shiota K. Stage-by-stage change in DNA methylation status of Dnmt1 locus during mouse early development. *J Biol Chem*. 2005 Mar 11;280(10):9627–34.
21. Megiorni F, Camero S, Ceccarelli S, McDowell HP, Mannarino O, Marampon F, et al. DNMT3B in vitro knocking-down is able to reverse embryonal rhabdomyosarcoma cell phenotype through inhibition of proliferation and induction of myogenic differentiation. *Oncotarget*. 2016 Nov 29;7(48):79342–56.
22. Bulusu V, Tumanov S, Michalopoulou E, van den Broek NJ, MacKay G, Nixon C, et al. Acetate Recapturing by Nuclear Acetyl-CoA Synthetase 2 Prevents Loss of Histone Acetylation during Oxygen and Serum Limitation. *Cell Reports*. 2017 Jan;18(3):647–58.
23. Lan X, Field MS, Stover PJ. Cell cycle regulation of folate-mediated one-carbon metabolism. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 2018 Nov;10(6):e1426.
24. Field MS, Kamynina E, Agunloye OC, Liebenthal RP, Lamarre SG, Brosnan ME, et al. Nuclear enrichment of folate cofactors and methylenetetrahydrofolate dehydrogenase 1 (MTHFD1) protect de novo thymidylate biosynthesis during folate deficiency. *J Biol Chem*. 2014 Oct 24;289(43):29642–50.
25. Wang YC, Lin WL, Lin YJ, Tang FY, Chen YM, Chiang EPI. A novel role of the tumor suppressor GNMT in cellular defense against DNA damage. *Int J Cancer*. 2014 Feb 15;134(4):799–810.
26. Matmat K, Conart JB, Graindorge PH, El Kouche S, Hassan Z, Siblini Y, et al. Correction: A transgenic mice model of retinopathy of cblG-type inherited disorder of one-carbon metabolism highlights epigenome-wide alterations related to cone photoreceptor cells development and retinal metabolism. *Clin Epigenetics*. 2024 Feb 8;16(1):23.

27. Katoh Y, Ikura T, Hoshikawa Y, Tashiro S, Ito T, Ohta M, et al. Methionine Adenosyltransferase II Serves as a Transcriptional Corepressor of Maf Oncoprotein. *Molecular Cell*. 2011 Mar;41(5):554–66.
28. Vermillion KL, Lidberg KA, Gammill LS. Cytoplasmic protein methylation is essential for neural crest migration. *J Cell Biol*. 2014 Jan 6;204(1):95–109.
29. Radomski N, Kaufmann C, Dreyer C. Nuclear accumulation of S-adenosylhomocysteine hydrolase in transcriptionally active cells during development of *Xenopus laevis*. *Mol Biol Cell*. 1999 Dec;10(12):4283–98.
30. Grbeša I, Kalo A, Belužić R, Kovačević L, Lepur A, Rokić F, et al. Mutations in S-adenosylhomocysteine hydrolase (AHCY) affect its nucleocytoplasmic distribution and capability to interact with S-adenosylhomocysteine hydrolase-like 1 protein. *Eur J Cell Biol*. 2017 Sep;96(6):579–90.
31. Kloor D, Hermes M, Fink K, Schmid H, Klingel K, Mack A, et al. Expression and localization of S-adenosylhomocysteine-hydrolase in the rat kidney following carbon monoxide induced hypoxia. *Cell Physiol Biochem*. 2007;19(1–4):57–66.
32. Kabil O, Zhou Y, Banerjee R. Human cystathionine beta-synthase is a target for sumoylation. *Biochemistry*. 2006 Nov 14;45(45):13528–36.
33. Field MS, Kamynina E, Chon J, Stover PJ. Nuclear Folate Metabolism. *Annu Rev Nutr*. 2018 Aug 21;38(1):219–43.
34. Cautain B, Hill R, de Pedro N, Link W. Components and regulation of nuclear transport processes. *FEBS J*. 2015 Feb;282(3):445–62.
35. Pérez-Miguelsanz J, Vallecillo N, Garrido F, Reytor E, Pérez-Sala D, Pajares MA. Betaine homocysteine S-methyltransferase emerges as a new player of the nuclear methionine cycle. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. 2017 Jul;1864(7):1165–82.
36. Portillo F, Vázquez J, Pajares MA. Protein-protein interactions involving enzymes of the mammalian methionine and homocysteine metabolism. *Biochimie*. 2020 Jun;173:33–47.
37. Zhao S, Torres A, Henry RA, Trefely S, Wallace M, Lee JV, et al. ATP-Citrate Lyase Controls a Glucose-to-Acetate Metabolic Switch. *Cell Reports*. 2016 Oct;17(4):1037–52.
38. Kera Y, Katoh Y, Ohta M, Matsumoto M, Takano-Yamamoto T, Igarashi K. Methionine Adenosyltransferase II-dependent Histone H3K9 Methylation at the COX-2 Gene Locus. *Journal of Biological Chemistry*. 2013 May;288(19):13592–601.
39. Chen Z, Chakraborty S, Banerjee R. Demonstration that mammalian methionine synthases are predominantly cobalamin-loaded. *J Biol Chem*. 1995 Aug 18;270(33):19246–9.

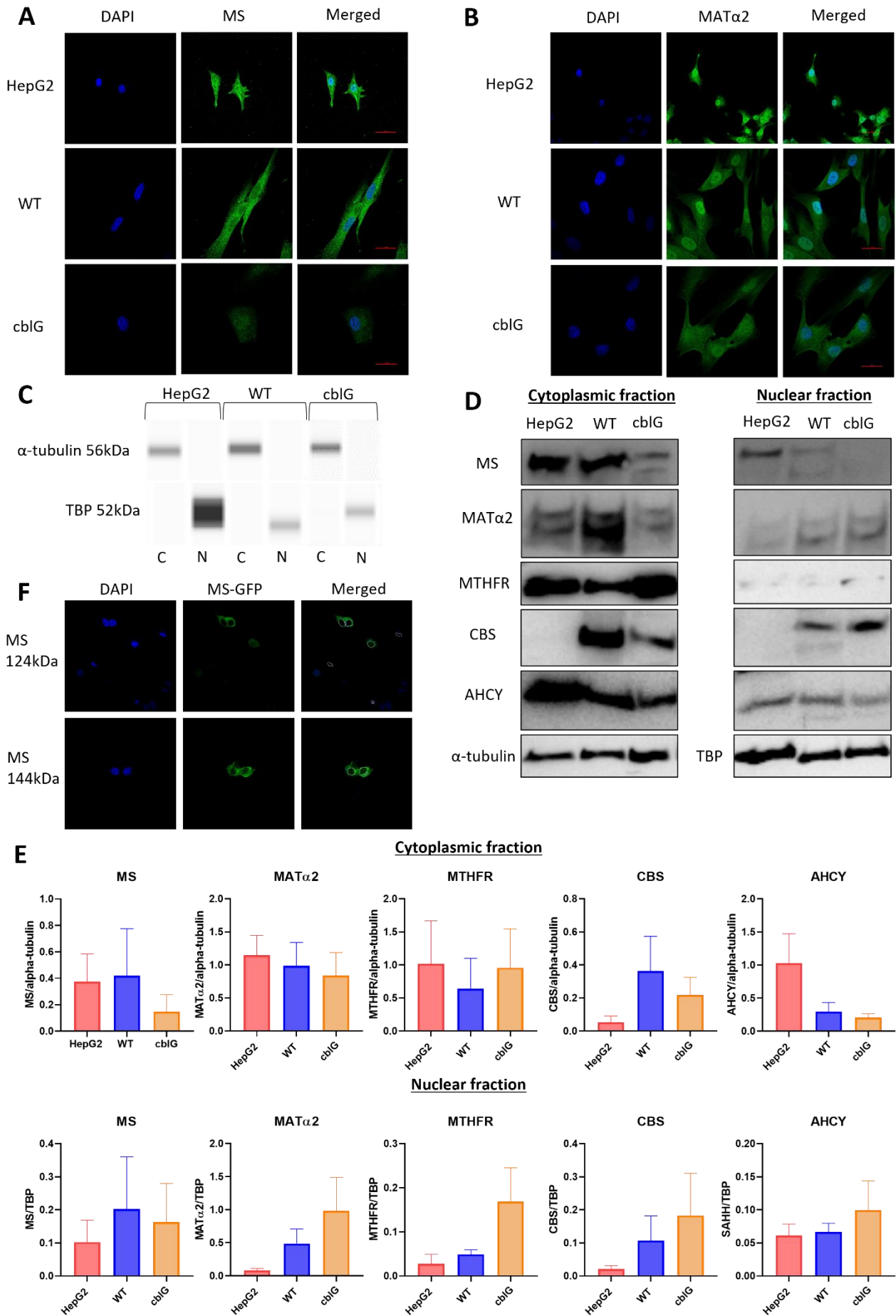


Figure 1: Enzymes of the methionine cycle are also located in the nucleus.

A and B: Immunofluorescence staining of MS and MAT α 2 in HepG2 cells, control (WT), and cblG fibroblasts. Cells were stained with anti-MS (A) and anti-MAT α 2 (B) antibodies and visualized by confocal microscopy (N=3).

C: Purity of subcellular fractions of HepG2 cells, control, and cblG fibroblasts prepared using the NE-PERTM nuclear and cytoplasmic extract reagent kit (Pierce). The nuclear and cytoplasmic extracts were subjected to WES capillary electrophoresis assay (ProteinSimple) for α -tubulin (cytoplasmic marker) and TATA Box Binding Protein TBP (nuclear marker) (N=12).

D: Subcellular location of the enzymes involved in the methionine cycle. Nuclear and cytoplasmic extracts were subjected to western blot against α -tubulin, TBP, methionine synthase (MS), MAT α 2, methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR), cystathionine β -synthase (CBS) and adenosyl homocysteinase (AHCY).

E: Densitometric analysis of each western blot and statistical analysis; mean of densitometry \pm SEM (N=3), Normality test and one-way ANOVA, GraphPad.

F: Expression of methionine synthase isoforms (124 kDa and 144 kDa) fused with green fluorescent protein (GFP) in HEK293T cells visualized by confocal microscopy (N=3).

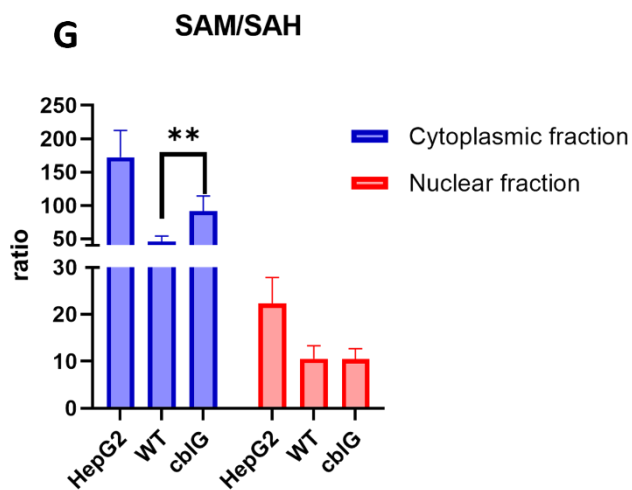
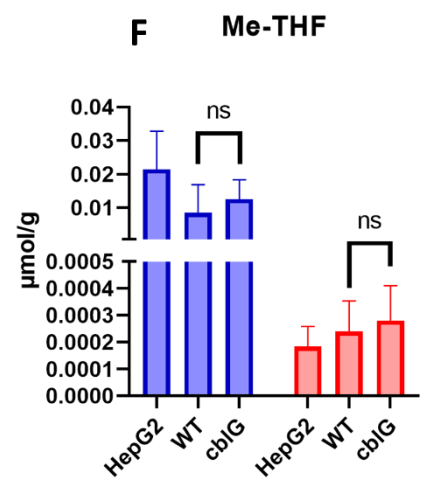
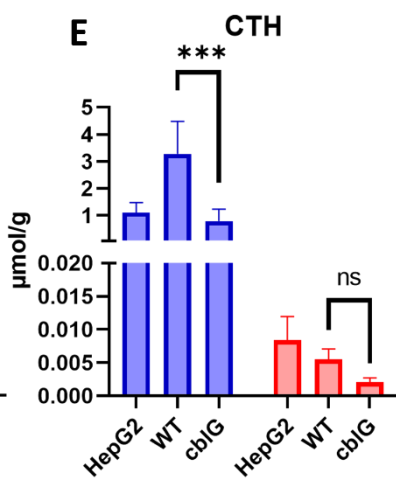
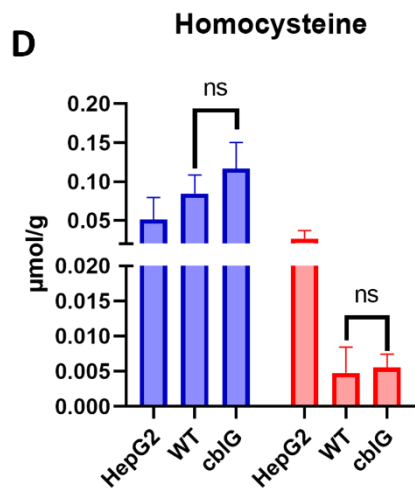
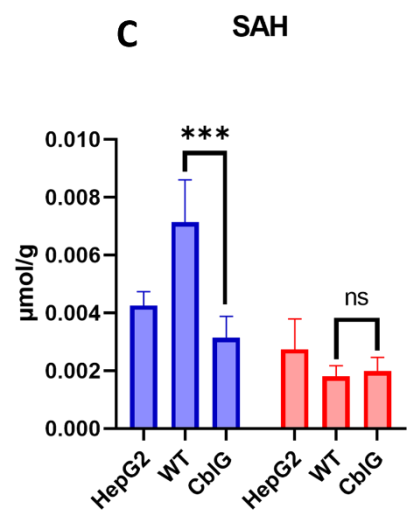
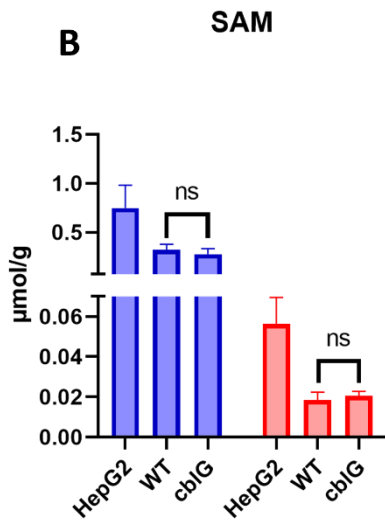
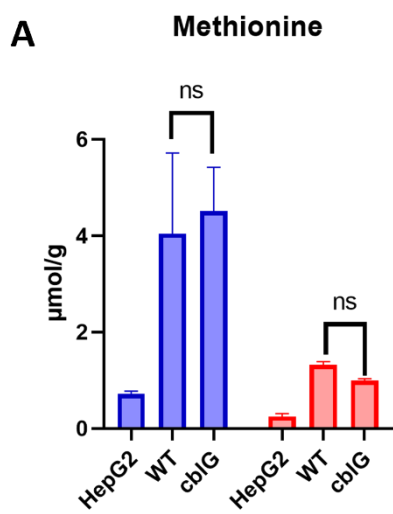
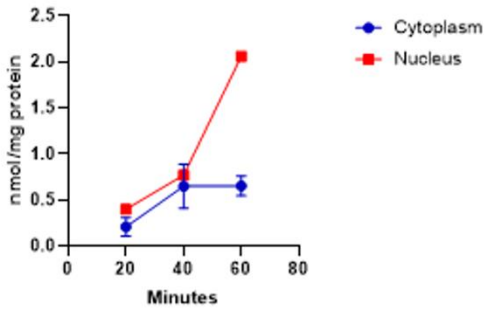


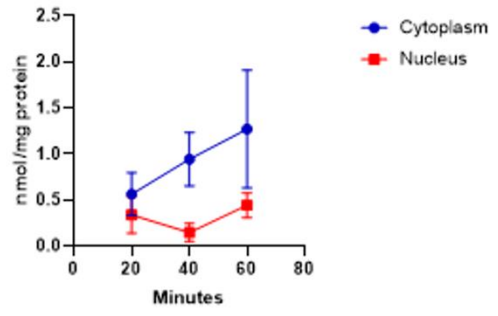
Figure 2: Evidence of one-carbon metabolism in cytoplasmic and nuclear fractions of HepG2 cells, control and cblG fibroblasts.

Metabolites of one-carbon metabolism were measured by LC/MS-MS in cytoplasmic and nuclear fractions of HepG2 cells, control (WT) and cblG fibroblasts; methionine (A), S-adenosyl-L-methionine (SAM) (B), S-adenosyl-homocysteine (SAH) (C), homocysteine (D), cystathionine (CTH) (E), 5-methyl-tetrahydrofolate (5-methyl-THF) (F) and methylation index SAM/SAH (G); Mean \pm SEM., n=3; ** p<0.01; *** p<0.001; Two-way ANOVA; GraphPad.

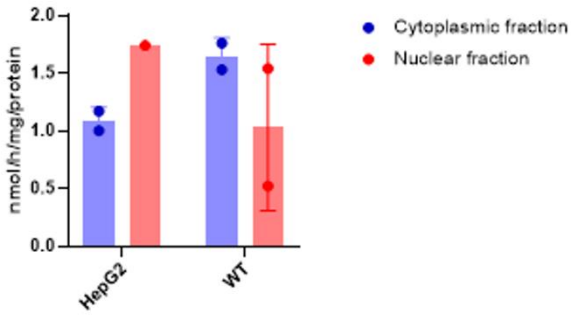
A MS enzymatic activity in HepG2 cells



B MS enzymatic activity in WT fibroblasts



C Enzymatic activity of MS



D

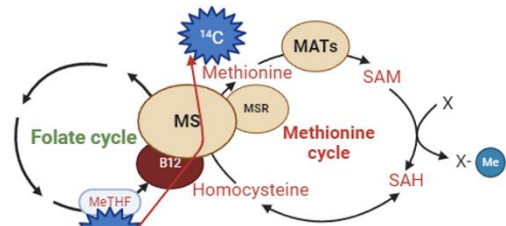


Figure 3: Methionine synthase enzymatic activity in HepG2 cells and control fibroblasts.

A and B: Kinetic of enzymatic activity of methionine synthase measured after the incorporation of 5-[¹⁴C]-methyl-THF in HepG2 cells (A) and control fibroblasts (WT) (B). Cytoplasmic and nuclear fractions were incubated with 5-[¹⁴C]-methyl-THF, and [¹⁴C] - methionine was measured after 20, 40 and 60 minutes of incubation; mean ± s.d., N=2.

C: Measurement of enzymatic activity of methionine synthase in cytoplasmic and nuclear fractions of HepG2 cells and control fibroblasts (WT); mean ± s.d., N=2.

D: Schematic representation of incorporation of 5-[¹⁴C]meTHF.

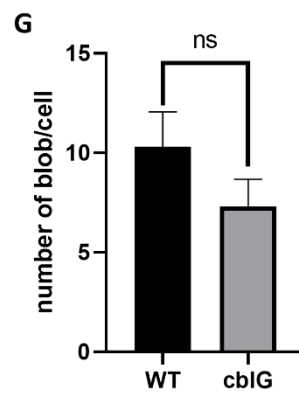
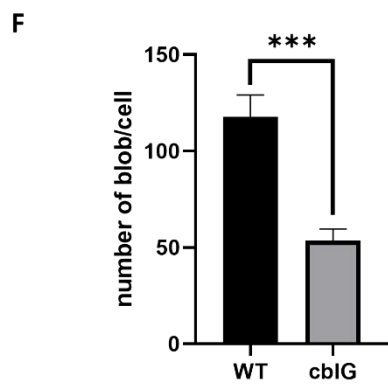
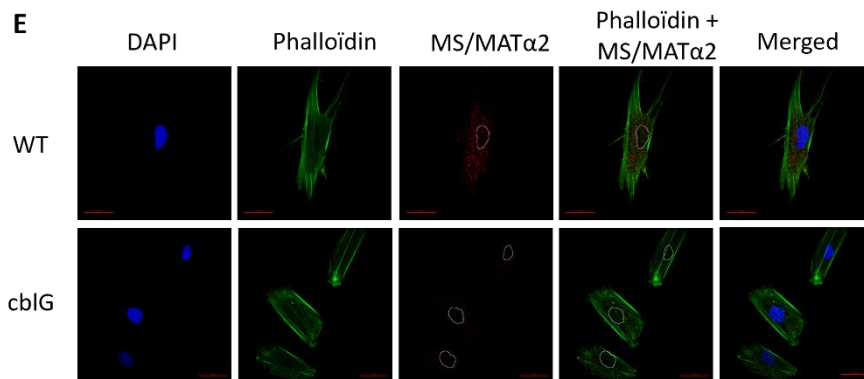
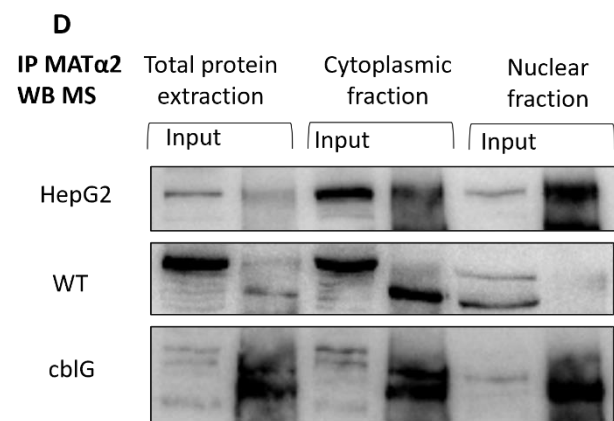
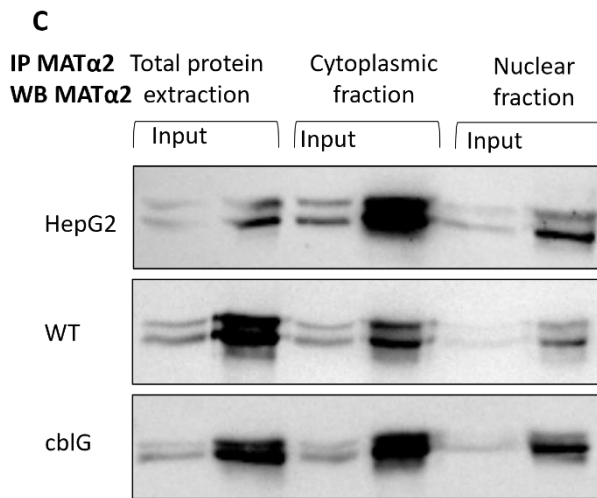
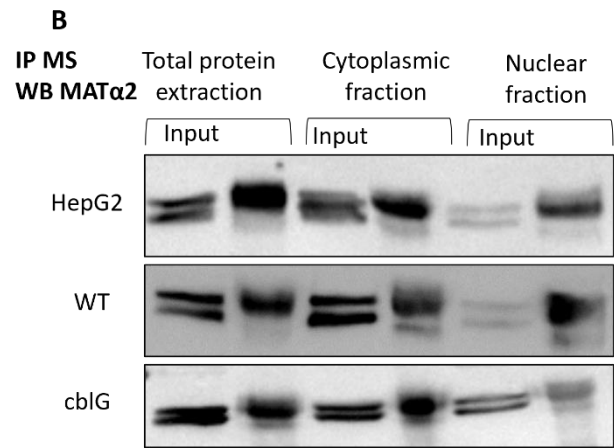
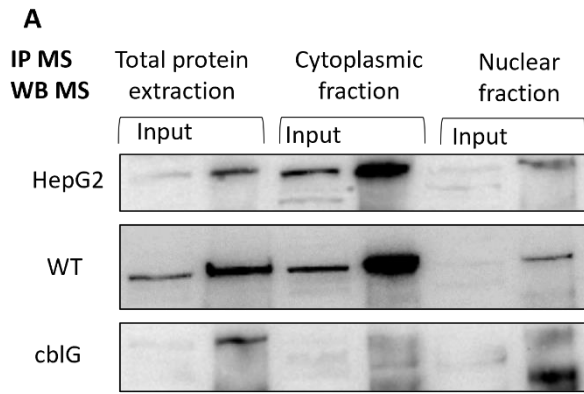


Figure 4: Evidence of protein-protein interaction between methionine synthase and methionine adenosyltransferase 2A (MAT α 2) in total protein extracts, cytoplasmic and nuclear fractions of HepG2 cells, control and cbIG fibroblasts.

A: Validation of methionine synthase (MS) immunoprecipitation. Co-immunoprecipitation assay was performed on total protein extract, cytoplasmic and nuclear fractions of HepG2 cells, control (WT), and cbIG fibroblast cells with an antibody against MS. Immunoprecipitated samples were subjected to western Blot against MS with another antibody (N=4).

B: Evidence of interaction between MS and MAT α 2 subunit. Co-immunoprecipitation assay was performed on total protein extract, cytoplasmic and nuclear fractions of HepG2 cells, control (WT), and cbIG fibroblast cells with an antibody against MS. Immunoprecipitated samples were subjected to western Blot against MAT α 2 (N=4).

C: Validation of immunoprecipitation of MAT α 2. Co-immunoprecipitation assay was performed on total protein extract, cytoplasmic and nuclear fractions of HepG2 cells, control (WT), and cbIG fibroblasts cells with an antibody against MAT α 2. Immunoprecipitated samples were subjected to western Blot against MAT α 2 with another antibody (N=3).

D: Validation of interaction between MS and MAT α 2. Co-immunoprecipitation assay was performed on total protein extract, cytoplasmic and nuclear fractions of HepG2 cells, control (WT), and cbIG fibroblasts cells with an antibody against MAT α 2. Immunoprecipitated samples were subjected to western Blot against MS (N=3)

E: Confirmation of interaction between MS and MAT α 2. Duolink[®] Proximity Ligation Assay was performed on control (WT), and cbIG fibroblasts. Red blobs indicate protein-protein interactions between MS and MAT α 2 (N=3).

F and G: Quantification of the number of blobs in the cytoplasm and in the nuclei of WT and cbIG fibroblasts (Mean \pm SEM, n=3; *** p<0,001; Two-way ANOVA; GraphPad).

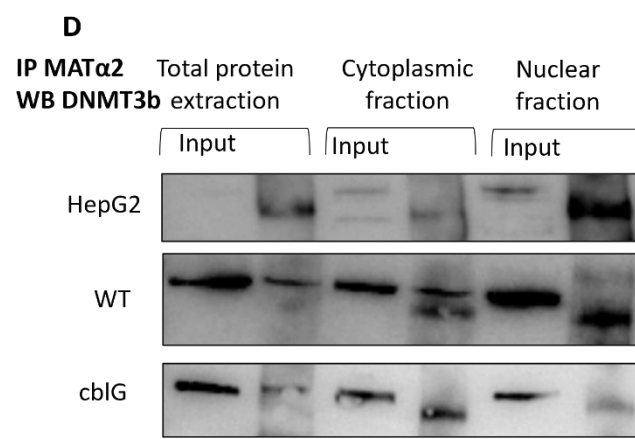
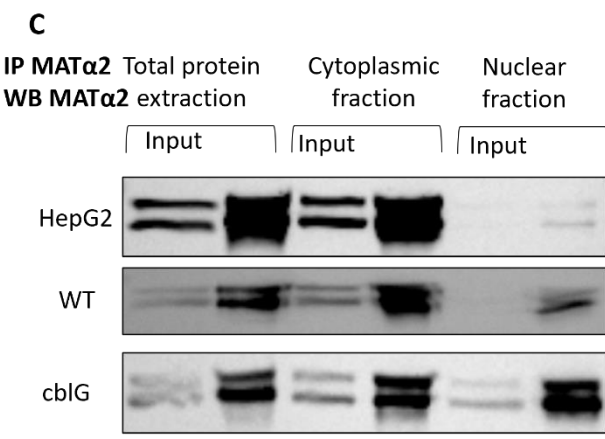
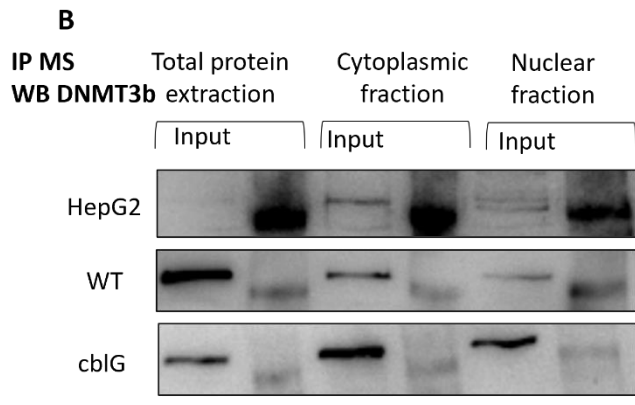
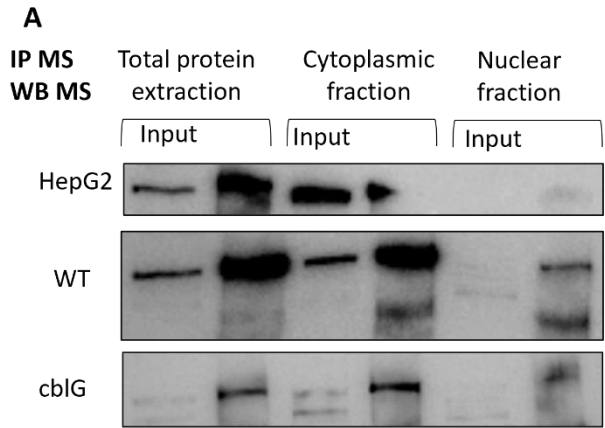


Figure 5: Evidence of protein-protein interaction between methionine synthase (MS), methionine adenosyl-transferase 2A (MAT α 2) and DNA methyltransferase 3b (DNMT3b) in total proteins extracts, cytoplasmic, and nuclear fractions of HepG2 cells, control, and cblG fibroblasts.

A: Validation of immunoprecipitation of MS in total protein extract, cytoplasmic and nuclear fractions of HepG2 cells, control (WT), and cblG fibroblasts cells as described in Figure 4A (N=4).

B: Evidence of interaction between MS and DNMT3b. Co-immunoprecipitation assay was performed on total protein extract, cytoplasmic and nuclear fractions of HepG2 cells, control (WT), and cblG fibroblasts cells with an antibody against methionine synthase (MS). Immunoprecipitated samples were subjected to western Blot against DNMT3b (N=3).

C: Validation of immunoprecipitation of MAT α 2 in total protein extract, cytoplasmic and nuclear fractions of HepG2 cells, control (WT), and cblG fibroblasts as described in Figure 4C (N=3).

D: Validation of interaction between MAT α 2a and DNMT3b. Co-immunoprecipitation assay was performed on total protein extract, cytoplasmic and nuclear fractions of HepG2 cells, control (WT), and cblG fibroblasts cells with antibody against MAT α 2. Immunoprecipitated samples were subjected to western Blot against DNMT3b (N=3).

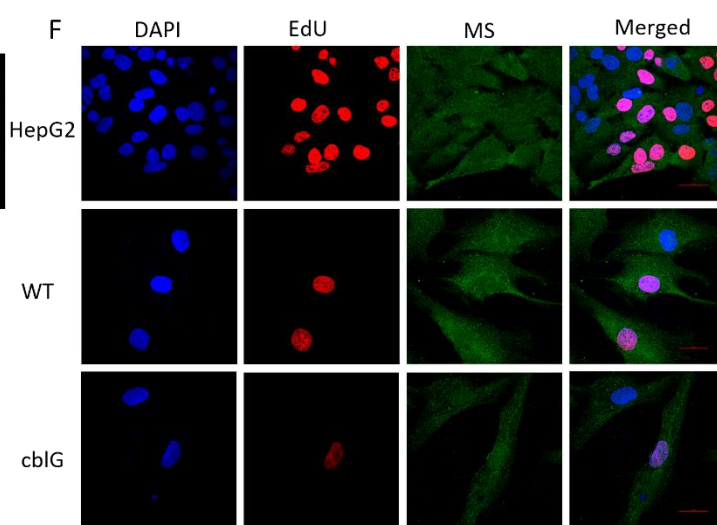
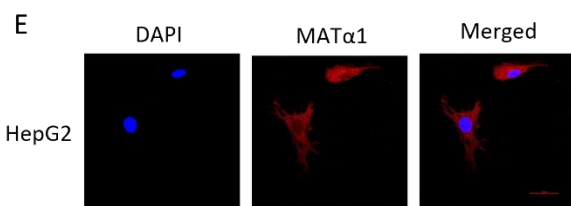
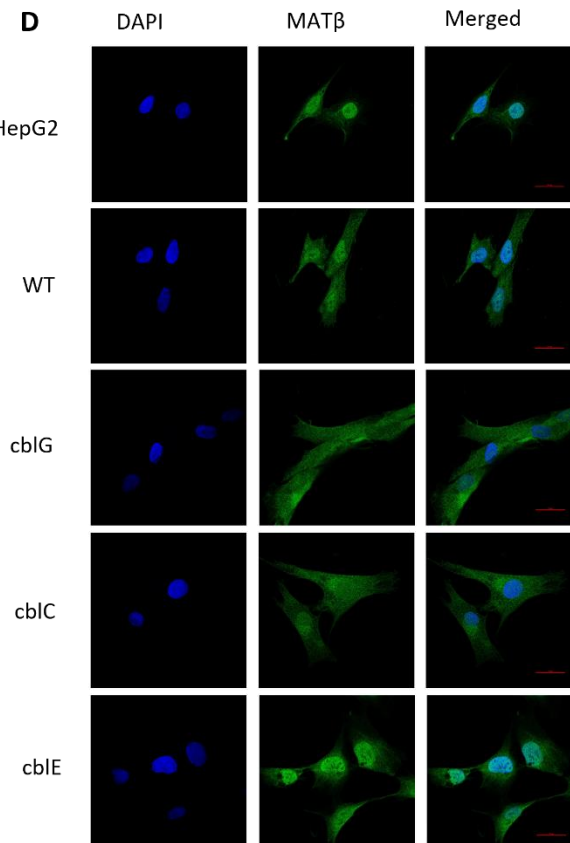
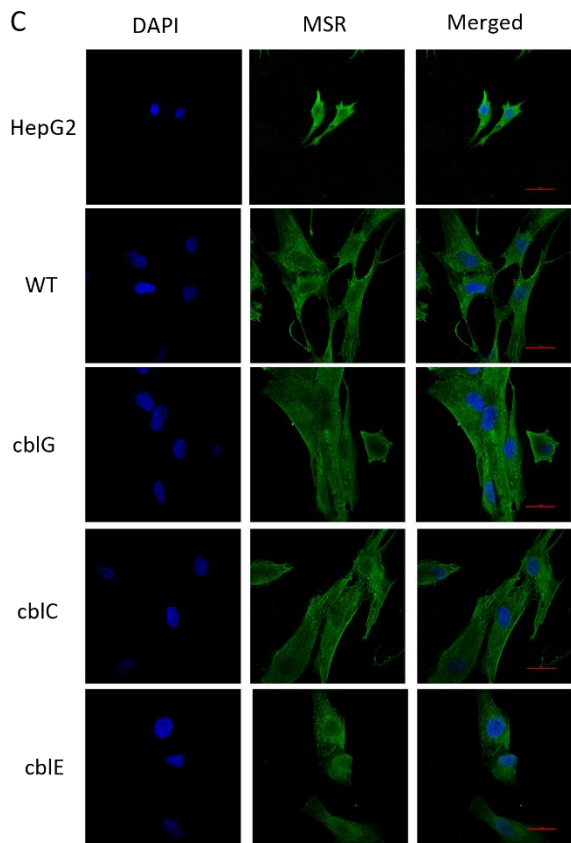
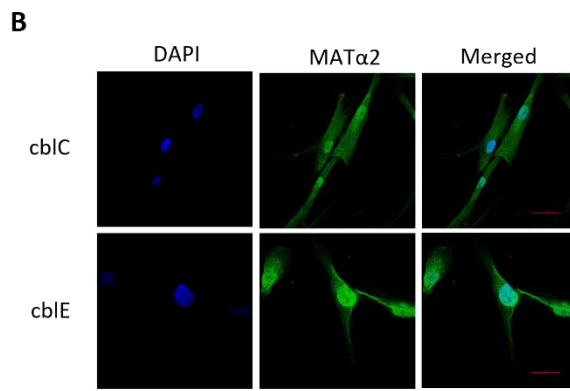
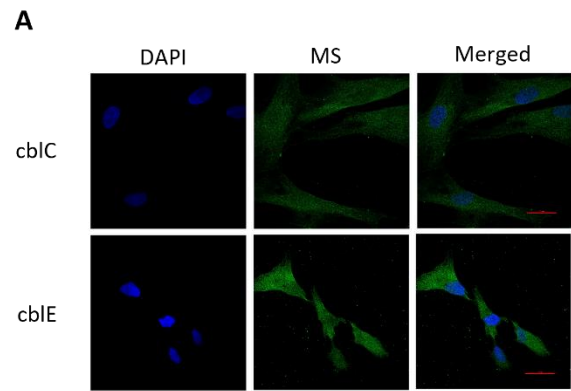


Fig. S1. Nuclear location of methionine synthase reductase (MSR), MAT α 1, MAT α 2 and MAT β in HepG2 cells, control and patient fibroblasts.

(A and B) Immunofluorescence staining of MS and MAT α 2 in cb1C and cb1E fibroblasts. Cells were stained with anti-MS (A) and anti-MAT α 2 (B) antibodies and visualized by confocal microscopy (N=3). cb1C cells are deficient in MMACHC, and cb1E cells are deficient in MSR. (C and D) Immunofluorescence staining of methionine synthase reductase (MSR) and MAT β in HepG2 cells, control (WT), cb1G, cb1C and cb1E fibroblasts. Cells were stained with anti-MSR and anti-MAT β antibodies (N=3). (E) Immunofluorescence staining of MAT α 1 in HepG2 cells. Cells were stained with anti-MAT α 1 antibody and visualized by confocal microscopy (N=3). (F) EdU Click-iTTM staining with immunofluorescence staining of MS in HepG2 cells, control (WT) and cb1G fibroblasts. Cells were stained with EdU and anti-MS antibody and visualized by confocal microscopy (N=3).

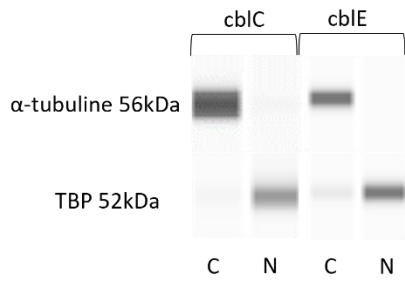
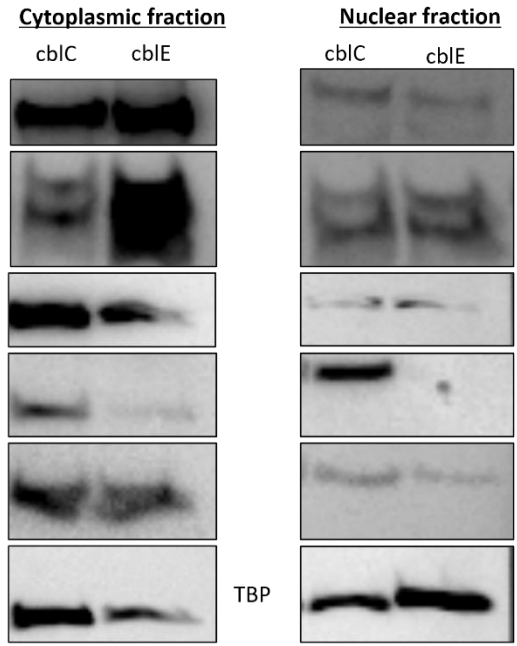
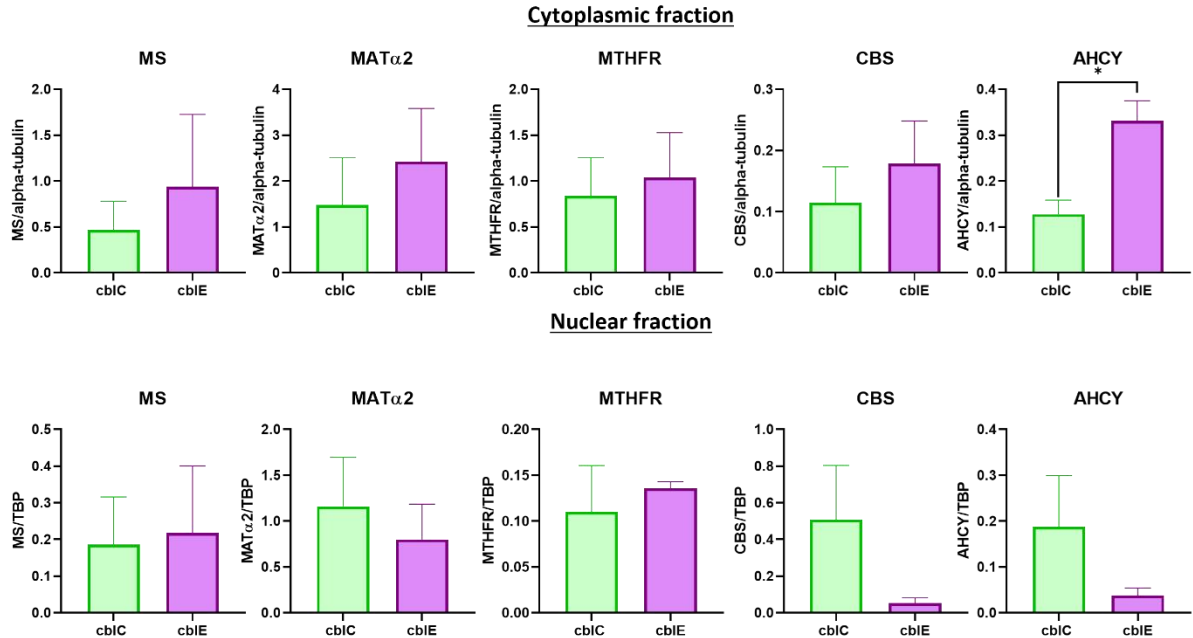
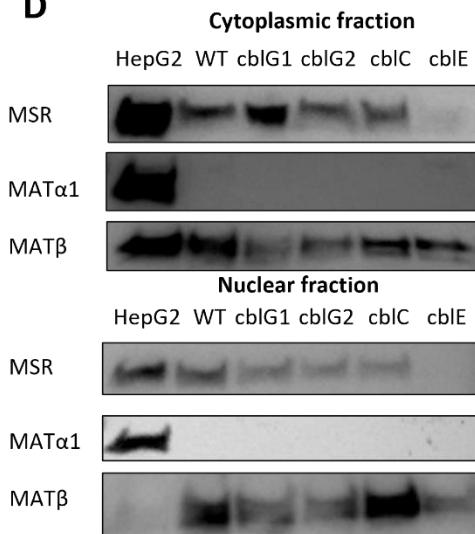
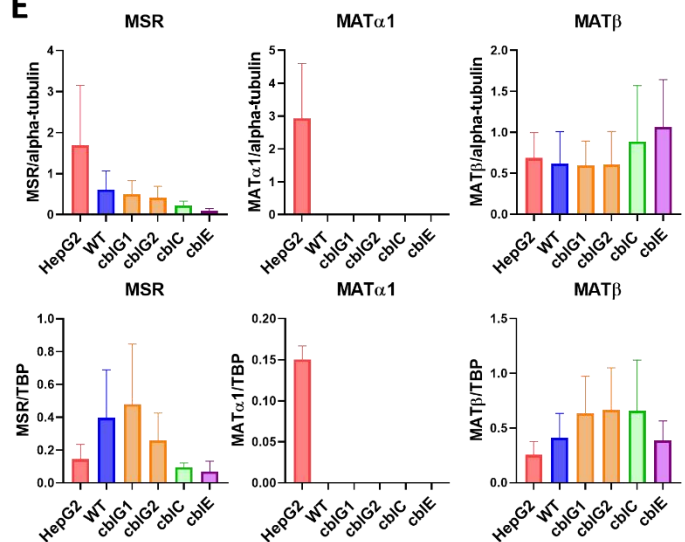
A**B****C****D****E**

Fig. S2. Nuclear location of other 1CM enzymes in HepG2 cells, control and patient fibroblasts.

(A) Purity of subcellular fractions of *cbIC* and *cbIE* fibroblasts prepared using the NE-PER™ nuclear and cytoplasmic extract reagent kit (Pierce). The nuclear and cytoplasmic extracts were subjected to WES assay (ProteinSimple) for α -tubulin (cytoplasmic marker) and TATA Box Binding Protein TBP (nuclear marker) (N=8). (B and D) Subcellular location of the enzymes involved in the methionine cycle. The nuclear and cytoplasmic extracts were subjected to Western blot against α -tubulin, TBP, methionine synthase (MS), MAT α 2, methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR), cystathionine β -synthase (CBS) and adenosylhomocysteinase (AHCY) (B); and methionine synthase reductase (MSR), MAT α 1 and MAT β (D) (N=3). (C and E) Densitometric analysis of each blot and statistical analysis (GraphPad); mean of densitometry \pm SEM (N=3), normality test and one-way ANOVA, GraphPad.

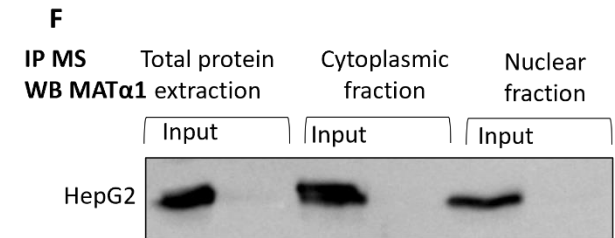
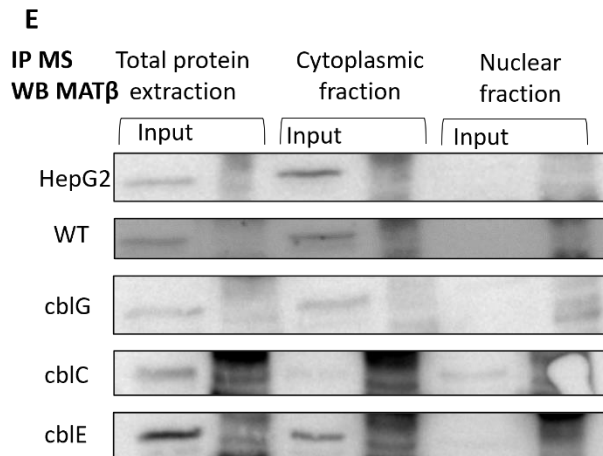
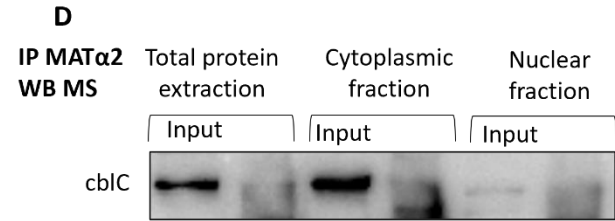
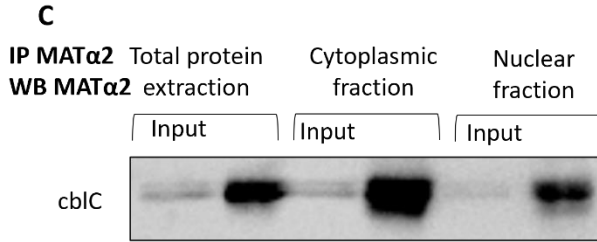
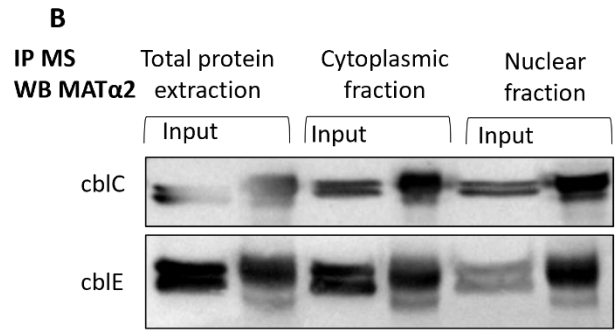
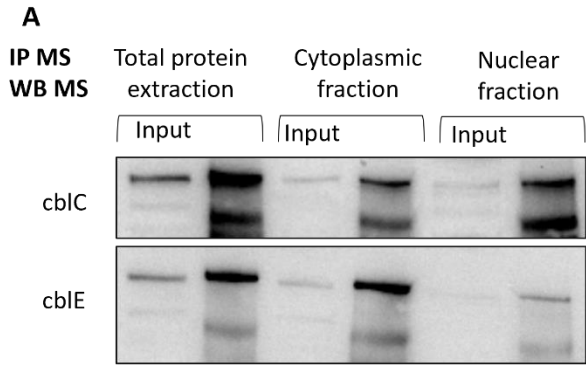


Fig. S3. Evidence of interaction between MS and MAT α 2 in CblC fibroblasts (deficient in MMACHC) and CblE fibroblasts (deficient in MSR).

(A) Validation of immunoprecipitation of MS on total protein extract, cytoplasmic, and nuclear fractions of cblC and cblE as described in Figure 4A (N=4). (B) Evidence of interaction between MS and MAT α 2 subunit in total protein extract, cytoplasmic, and nuclear fractions of cblC and cblE as described in Figure 4 B (N=4). (C) Validation of immunoprecipitation of MAT α 2 on total protein extract, cytoplasmic, and nuclear fractions of cblC as described in Figure 4C (N=3). (D) Validation of interaction between MS and MAT α 2 on total protein extract, cytoplasmic, and nuclear fractions of cblC and cblE as described in Figure 4D (N=3). (E) Absence of interaction between MS and MAT β . Co-immunoprecipitation assay was performed on HepG2 cells, control (WT), cblG, cblC, and cblE fibroblasts with antibody against methionine synthase (MS). Immunoprecipitated samples were subjected to western Blot against MAT β (N=4). (F) Absence of interaction between MS and MAT α 1. Co-immunoprecipitation assay was performed on HepG2 cells with antibody against methionine synthase (MS). Immunoprecipitated samples were subjected to western Blot against MAT α 1 (N=4).

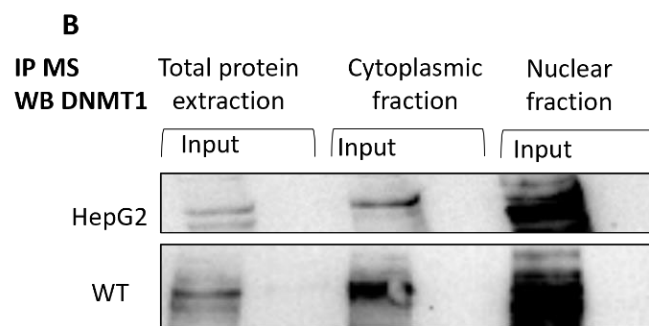
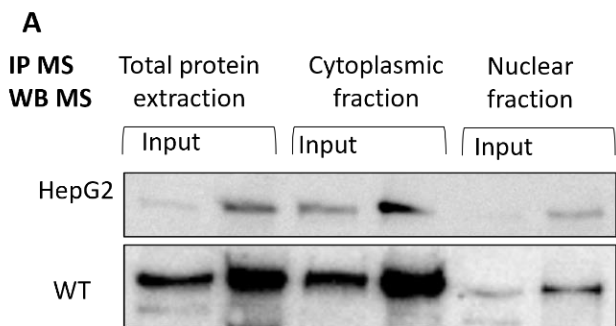


Fig. S4. Evidence of absence of protein-protein interaction between methionine synthase (MS) and DNA methyltransferase 1 (DNMT1) in total protein extracts, cytoplasmic and nuclear fractions of HepG2 cells, control, and CblG fibroblasts.

(A) Validation of immunoprecipitation of MS in total protein extract, cytoplasmic and nuclear fractions of HepG2 cells and control (WT) fibroblasts as described in Figure 4A (N=4). (B) Absence of interaction between MS and DNMT1. Co-immunoprecipitation assay was performed on total protein extract, cytoplasmic and nuclear fractions of HepG2 cells and control (WT) fibroblast cells with an antibody against methionine synthase (MS). Immunoprecipitated samples were subjected to western Blot against DNMT1 (N=3).

Bibliographie

- Acuner Ozbabacan, Saliha Ece, Hatice Billur Engin, Attila Gursoy, et Ozlem Keskin. 2011. « Transient Protein-Protein Interactions ». *Protein Engineering, Design & Selection: PEDS* 24 (9): 635-48. <https://doi.org/10.1093/protein/gzr025>.
- Agrimi, G., M. A. Di Noia, C. M. T. Marobbio, G. Fiermonte, F. M. Lasorsa, et F. Palmieri. 2004. « Identification of the Human Mitochondrial S-Adenosylmethionine Transporter: Bacterial Expression, Reconstitution, Functional Characterization and Tissue Distribution ». *The Biochemical Journal* 379 (Pt 1): 183-90. <https://doi.org/10.1042/BJ20031664>.
- Altawil, Lama, Hind Alshihry, Hala Ahmed, Hanan E. Shamseldin, et Fowzan Alkuraya. 2020. « Vitamin B12 Deficiency Secondary to Cobalamin F Deficiency Simulating Dyskeratosis Congenita ». *JAAD Case Reports* 6 (9): 882-85. <https://doi.org/10.1016/j.jdc.2020.07.011>.
- Anderson, Donald D., Collynn F. Woeller, et Patrick J. Stover. 2007. « Small ubiquitin-like modifier-1 (SUMO-1) modification of thymidylate synthase and dihydrofolate reductase ». *Clinical Chemical Laboratory Medicine* 45 (12). <https://doi.org/10.1515/CCLM.2007.355>.
- Andrès, E., S. Affenberger, S. Vinzio, E. Noel, G. Kaltenbach, et J.-L. Schlienger. 2005. « [Cobalamin deficiencies in adults: update of etiologies, clinical manifestations and treatment] ». *La Revue De Medecine Interne* 26 (12): 938-46. <https://doi.org/10.1016/j.revmed.2005.04.036>.
- Avery, O. T., C. M. Macleod, et M. McCarty. 1944. « STUDIES ON THE CHEMICAL NATURE OF THE SUBSTANCE INDUCING TRANSFORMATION OF PNEUMOCOCCAL TYPES : INDUCTION OF TRANSFORMATION BY A DESOXYRIBONUCLEIC ACID FRACTION ISOLATED FROM PNEUMOCOCCUS TYPE III ». *The Journal of Experimental Medicine* 79 (2): 137-58. <https://doi.org/10.1084/jem.79.2.137>.
- Bacci, Giacomo M., Maria A. Donati, Elisabetta Pasquini, Francis Munier, Catia Cavicchi, Amelia Morrone, Andrea Sodi, et al. 2017. « Optical Coherence Tomography Morphology and Evolution in cbLC Disease-Related Maculopathy in a Case Series of Very Young Patients ». *Acta Ophthalmologica* 95 (8): e776-82. <https://doi.org/10.1111/aos.13441>.
- Banerjee, R. V., N. L. Johnston, J. K. Sobeski, P. Datta, et R. G. Matthews. 1989. « Cloning and Sequence Analysis of the Escherichia Coli metH Gene Encoding Cobalamin-Dependent Methionine Synthase and Isolation of a Tryptic Fragment Containing the Cobalamin-Binding Domain ». *The Journal of Biological Chemistry* 264 (23): 13888-95.
- Banerjee, R. V., et R. G. Matthews. 1990. « Cobalamin-Dependent Methionine Synthase ». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 4 (5): 1450-59. <https://doi.org/10.1096/fasebj.4.5.2407589>.
- Banerjee, Ruma. 2006. « B12 Trafficking in Mammals: A for Coenzyme Escort Service ». *ACS Chemical Biology* 1 (3): 149-59. <https://doi.org/10.1021/cb6001174>.
- Banerjee, Ruma, et Stephen W. Ragsdale. 2003. « The Many Faces of Vitamin B12: Catalysis by Cobalamin-Dependent Enzymes ». *Annual Review of Biochemistry* 72:209-47. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.72.121801.161828>.
- Bassila, Christine, Rose Ghemrawi, Justine Flayac, D. Sean Froese, Matthias R. Baumgartner, Jean-Louis Guéant, et David Coelho. 2017. « Methionine Synthase and Methionine Synthase Reductase Interact with MMACHC and with MMADHC ». *Biochimica Et Biophysica Acta. Molecular Basis of Disease* 1863 (1): 103-12. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.10.016>.

- Battaglia-Hsu, Shyue-Fang, Rose Ghemrawi, David Coelho, Natacha Dreumont, Pauline Mosca, Sébastien Hergalant, Guillaume Gauchotte, et al. 2018. « Inherited Disorders of Cobalamin Metabolism Disrupt Nucleocytoplasmic Transport of mRNA through Impaired Methylation/Phosphorylation of ELAVL1/HuR ». *Nucleic Acids Research* 46 (15): 7844-57. <https://doi.org/10.1093/nar/gky634>.
- Bauchart-Thevret, Caroline, Barbara Stoll, Shaji Chacko, et Douglas G. Burrin. 2009. « Sulfur Amino Acid Deficiency Upregulates Intestinal Methionine Cycle Activity and Suppresses Epithelial Growth in Neonatal Pigs ». *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 296 (6): E1239-1250. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.91021.2008>.
- Beadle, G. W., et E. L. Tatum. 1941. « Genetic Control of Biochemical Reactions in Neurospora ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 27 (11): 499-506. <https://doi.org/10.1073/pnas.27.11.499>.
- Beaudin, Anna E, Elena V Abarinov, Drew M Noden, Cheryll A Perry, Stephanie Chu, Sally P Stabler, Robert H Allen, et Patrick J Stover. 2011. « Shmt1 and de Novo Thymidylate Biosynthesis Underlie Folate-Responsive Neural Tube Defects in Mice ». *The American Journal of Clinical Nutrition* 93 (4): 789-98. <https://doi.org/10.3945/ajcn.110.002766>.
- Beaudin, Anna E, Cheryll A Perry, Sally P Stabler, Robert H Allen, et Patrick J Stover. 2012. « Maternal Mthfd1 Disruption Impairs Fetal Growth but Does Not Cause Neural Tube Defects in Mice ». *The American Journal of Clinical Nutrition* 95 (4): 882-91. <https://doi.org/10.3945/ajcn.111.030783>.
- Bestor, T., A. Laudano, R. Mattaliano, et V. Ingram. 1988. « Cloning and Sequencing of a cDNA Encoding DNA Methyltransferase of Mouse Cells. The Carboxyl-Terminal Domain of the Mammalian Enzymes Is Related to Bacterial Restriction Methyltransferases ». *Journal of Molecular Biology* 203 (4): 971-83. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(88\)90122-2](https://doi.org/10.1016/0022-2836(88)90122-2).
- Birn, Henrik, Thomas E. Willnow, Rikke Nielsen, Anthony G. W. Norden, Christian Bönsch, Søren K. Moestrup, Ebba Nexø, et Erik I. Christensen. 2002. « Megalin Is Essential for Renal Proximal Tubule Reabsorption and Accumulation of Transcobalamin-B(12) ». *American Journal of Physiology. Renal Physiology* 282 (3): F408-416. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00206.2000>.
- Boon, Ruben. 2021. « Metabolic Fuel for Epigenetic: Nuclear Production Meets Local Consumption ». *Frontiers in Genetics* 12 (novembre):768996. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.768996>.
- Boon, Ruben, Giorgia G. Silveira, et Raul Mostoslavsky. 2020. « Nuclear Metabolism and the Regulation of the Epigenome ». *Nature Metabolism* 2 (11): 1190-1203. <https://doi.org/10.1038/s42255-020-00285-4>.
- Brosnan, John T., et Margaret E. Brosnan. 2006. « The Sulfur-Containing Amino Acids: An Overview ». *The Journal of Nutrition* 136 (6 Suppl): 1636S-1640S. <https://doi.org/10.1093/jn/136.6.1636S>.
- . 2020. « Formate and Its Role in Amino Acid Metabolism ». *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care* 23 (1): 23-28. <https://doi.org/10.1097/MCO.0000000000000611>.
- Brosnan, John T., Margaret E. Brosnan, Robert F. P. Bertolo, et Janet A. Brunton. 2007. « Methionine: A metabolically unique amino acid ». *Livestock Science, Special section: Non-Ruminant Nutrition Symposium*, 112 (1): 2-7. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2007.07.005>.

- Bulusu, Vinay, Sergey Tumanov, Evdokia Michalopoulou, Niels J. van den Broek, Gillian MacKay, Colin Nixon, Sandeep Dhayade, et al. 2017. « Acetate Recapturing by Nuclear Acetyl-CoA Synthetase 2 Prevents Loss of Histone Acetylation during Oxygen and Serum Limitation ». *Cell Reports* 18 (3): 647-58. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.12.055>.
- Cai, Ling, Benjamin M. Sutter, Bing Li, et Benjamin P. Tu. 2011. « Acetyl-CoA Induces Cell Growth and Proliferation by Promoting the Acetylation of Histones at Growth Genes ». *Molecular Cell* 42 (4): 426-37. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.05.004>.
- Cambronne, Xiaolu A., et W. Lee Kraus. 2020. « Location, Location, Location: Compartmentalization of NAD⁺ Synthesis and Functions in Mammalian Cells ». *Trends in Biochemical Sciences* 45 (10): 858-73. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2020.05.010>.
- Cantoni, G. L., et J. Durell. 1957. « Activation of Methionine for Transmethylation. II. The Methionine-Activating Enzyme; Studies on the Mechanism of the Reaction ». *The Journal of Biological Chemistry* 225 (2): 1033-48.
- Carmel, Ralph. 2003. « Mild Transcobalamin I (Haptocorrin) Deficiency and Low Serum Cobalamin Concentrations ». *Clinical Chemistry* 49 (8): 1367-74. <https://doi.org/10.1373/49.8.1367>.
- Carmel, Ralph, James Parker, et Zvi Kelman. 2009. « Genomic Mutations Associated with Mild and Severe Deficiencies of Transcobalamin I (Haptocorrin) That Cause Mildly and Severely Low Serum Cobalamin Levels ». *British Journal of Haematology* 147 (3): 386-91. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2009.07855.x>.
- Carr, D F, G Whiteley, A Alfirevic, et M Pirmohamed. 2009. « Investigation of Inter-Individual Variability of the One-Carbon Folate Pathway: A Bioinformatic and Genetic Review ». *The Pharmacogenomics Journal* 9 (5): 291-305. <https://doi.org/10.1038/tpj.2009.29>.
- Caudill, M. A., J. C. Wang, S. Melnyk, I. P. Pogribny, S. Jernigan, M. D. Collins, J. Santos-Guzman, M. E. Swendseid, E. A. Cogger, et S. J. James. 2001. « Intracellular S-Adenosylhomocysteine Concentrations Predict Global DNA Hypomethylation in Tissues of Methyl-Deficient Cystathionine Beta-Synthase Heterozygous Mice ». *The Journal of Nutrition* 131 (11): 2811-18. <https://doi.org/10.1093/jn/131.11.2811>.
- Cautain, Bastien, Richard Hill, Nuria de Pedro, et Wolfgang Link. 2015. « Components and Regulation of Nuclear Transport Processes ». *The FEBS Journal* 282 (3): 445-62. <https://doi.org/10.1111/febs.13163>.
- Centers for Disease Control (CDC). 1991. « Use of Folic Acid for Prevention of Spina Bifida and Other Neural Tube Defects--1983-1991 ». *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report* 40 (30): 513-16.
- Chawla, Jasvinder, et David Kvarnberg. 2014. « Hydrosoluble Vitamins ». *Handbook of Clinical Neurology* 120:891-914. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-4087-0.00059-0>.
- Chiang, P. K., et G. L. Cantoni. 1977. « Activation of Methionine for Transmethylation. Purification of the S-Adenosylmethionine Synthetase of Bakers' Yeast and Its Separation into Two Forms ». *The Journal of Biological Chemistry* 252 (13): 4506-13.
- Christie, Mary, Chiung-Wen Chang, Gergely Róna, Kate M. Smith, Alastair G. Stewart, Agnes A. S. Takeda, Marcos R. M. Fontes, et al. 2016. « Structural Biology and Regulation of Protein Import into the Nucleus ». *Journal of Molecular Biology* 428 (10 Pt A): 2060-90. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.10.023>.
- Clarke, Steven, et Fuyuhiko Tamanoi. 2004. « Fighting Cancer by Disrupting C-Terminal Methylation of Signaling Proteins ». *The Journal of Clinical Investigation* 113 (4): 513-15. <https://doi.org/10.1172/JCI21059>.

- Coelho, David, Jaeseung C. Kim, Isabelle R. Miousse, Stephen Fung, Marcel du Moulin, Insa Buers, Terttu Suormala, et al. 2012. « Mutations in ABCD4 Cause a New Inborn Error of Vitamin B12 Metabolism ». *Nature Genetics* 44 (10): 1152-55. <https://doi.org/10.1038/ng.2386>.
- Coelho, David, Terttu Suormala, Martin Stucki, Jordan P. Lerner-Ellis, David S. Rosenblatt, Robert F. Newbold, Matthias R. Baumgartner, et Brian Fowler. 2008. « Gene Identification for the cblD Defect of Vitamin B₁₂ Metabolism ». *New England Journal of Medicine* 358 (14): 1454-64. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa072200>.
- Col, Bekir, Sebastian Oltean, et Ruma Banerjee. 2007. « Translational Regulation of Human Methionine Synthase by Upstream Open Reading Frames ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1769 (9-10): 532-40. <https://doi.org/10.1016/j.bbaexp.2007.06.003>.
- Cooper, B. A., et D. S. Rosenblatt. 1987. « Inherited Defects of Vitamin B12 Metabolism ». *Annual Review of Nutrition* 7:291-320. <https://doi.org/10.1146/annurev.nu.07.070187.001451>.
- Coulondre, C., J. H. Miller, P. J. Farabaugh, et W. Gilbert. 1978. « Molecular Basis of Base Substitution Hotspots in Escherichia Coli ». *Nature* 274 (5673): 775-80. <https://doi.org/10.1038/274775a0>.
- Cusick, Michael E., Niels Klitgord, Marc Vidal, et David E. Hill. 2005. « Interactome: Gateway into Systems Biology ». *Human Molecular Genetics* 14 Spec No. 2 (octobre):R171-181. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddi335>.
- Dann, Stephen G, Michael Ryskin, Anthony M Barsotti, Jonathon Golas, Celine Shi, Miriam Miranda, Christine Hosselet, et al. 2015. « Reciprocal Regulation of Amino Acid Import and Epigenetic State through Lat1 and EZH 2 ». *The EMBO Journal* 34 (13): 1773-85. <https://doi.org/10.15252/embj.201488166>.
- Day, Dorothy. 1935. « SOME CHEMICAL ASPECTS OF CALCIUM DEFICIENCY EFFECTS ON *PISUM SATIVUM* ». *Plant Physiology* 10 (4): 811-16. <https://doi.org/10.1104/pp.10.4.811>.
- De Las Rivas, Javier, et Celia Fontanillo. 2010. « Protein-Protein Interactions Essentials: Key Concepts to Building and Analyzing Interactome Networks ». *PLoS Computational Biology* 6 (6): e1000807. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000807>.
- Delgado, Miguel, Francisco Garrido, Juliana Pérez-Miguelsanz, María Pacheco, Teresa Partearroyo, Dolores Pérez-Sala, et María Angeles Pajares. 2014. « Acute Liver Injury Induces Nucleocytoplasmic Redistribution of Hepatic Methionine Metabolism Enzymes ». *Antioxidants & Redox Signaling* 20 (16): 2541-54. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5342>.
- DeLong, C. J., Y. J. Shen, M. J. Thomas, et Z. Cui. 1999. « Molecular Distinction of Phosphatidylcholine Synthesis between the CDP-Choline Pathway and Phosphatidylethanolamine Methylation Pathway ». *The Journal of Biological Chemistry* 274 (42): 29683-88. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.42.29683>.
- Deme, Justin C., Isabelle R. Miousse, Maria Plesa, Jaeseung C. Kim, Mark A. Hancock, Wayne Mah, David S. Rosenblatt, et James W. Coulton. 2012. « Structural Features of Recombinant MMADHC Isoforms and Their Interactions with MMACHC, Proteins of Mammalian Vitamin B12 Metabolism ». *Molecular Genetics and Metabolism* 107 (3): 352-62. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2012.07.001>.
- Dempsey-Nunez, Laura, Margaret L. Illson, Jana Kent, Qiuying Huang, Alison Brebner, David Watkins, Brian M. Gilfix, Carl T. Wittwer, et David S. Rosenblatt. 2012. « High Resolution Melting Analysis of the MMAA Gene in Patients with cblA and in Those with

- Undiagnosed Methylmalonic Aciduria ». *Molecular Genetics and Metabolism* 107 (3): 363-67. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2012.09.012>.
- Desrosiers, R., K. Friderici, et F. Rottman. 1974. « Identification of Methylated Nucleosides in Messenger RNA from Novikoff Hepatoma Cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 71 (10): 3971-75. <https://doi.org/10.1073/pnas.71.10.3971>.
- Dobson, C. Melissa, Timothy Wai, Daniel Leclerc, Hakan Kadir, Monica Narang, Jordan P. Lerner-Ellis, Thomas J. Hudson, David S. Rosenblatt, et Roy A. Gravel. 2002. « Identification of the Gene Responsible for the cblB Complementation Group of Vitamin B12-Dependent Methylmalonic Aciduria ». *Human Molecular Genetics* 11 (26): 3361-69. <https://doi.org/10.1093/hmg/11.26.3361>.
- Dobson, C. Melissa, Timothy Wai, Daniel Leclerc, Aaron Wilson, Xuchu Wu, Carole Doré, Thomas Hudson, David S. Rosenblatt, et Roy A. Gravel. 2002. « Identification of the Gene Responsible for the cblA Complementation Group of Vitamin B12-Responsive Methylmalonic Acidemia Based on Analysis of Prokaryotic Gene Arrangements ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (24): 15554-59. <https://doi.org/10.1073/pnas.242614799>.
- Doets, Esmée L., Paulette H. In 't Veld, Anna Szczecińska, Rosalie A. M. Dhonukshe-Rutten, Adrienne E. J. M. Cavelaars, Pieter van 't Veer, Anna Brzozowska, et Lisette C. P. G. M. de Groot. 2013. « Systematic Review on Daily Vitamin B12 Losses and Bioavailability for Deriving Recommendations on Vitamin B12 Intake with the Factorial Approach ». *Annals of Nutrition & Metabolism* 62 (4): 311-22. <https://doi.org/10.1159/000346968>.
- Dölle, Christian, Marc Niere, Emilia Lohndal, et Mathias Ziegler. 2010. « Visualization of Subcellular NAD Pools and Intra-Organellar Protein Localization by Poly-ADP-Ribose Formation ». *Cellular and Molecular Life Sciences* 67 (3): 433-43. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0190-4>.
- Dominissini, Dan, Sharon Moshitch-Moshkovitz, Schraga Schwartz, Mali Salmon-Divon, Lior Ungar, Sivan Osenberg, Karen Cesarkas, et al. 2012. « Topology of the Human and Mouse m6A RNA Methylomes Revealed by m6A-Seq ». *Nature* 485 (7397): 201-6. <https://doi.org/10.1038/nature11112>.
- Drennan, C. L., R. G. Matthews, et M. L. Ludwig. 1994. « Cobalamin-Dependent Methionine Synthase: The Structure of a Methylcobalamin-Binding Fragment and Implications for Other B12-Dependent Enzymes ». *Current Opinion in Structural Biology* 4 (6): 919-29. [https://doi.org/10.1016/0959-440x\(94\)90275-5](https://doi.org/10.1016/0959-440x(94)90275-5).
- Du Vigneaud, V., M. Cohn, J. P. Chandler, J. R. Schenck, et S. Simmonds. 1974. « Nutrition Classics from The Journal of Biological Chemistry 140:625-641, 1941. The Utilization of the Methyl Group of Methionine in the Biological Synthesis of Choline and Creatine ». *Nutrition Reviews* 32 (5): 144-46. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.1974.tb06306.x>.
- Dubin, D. T., et R. H. Taylor. 1975. « The Methylation State of Poly A-Containing Messenger RNA from Cultured Hamster Cells ». *Nucleic Acids Research* 2 (10): 1653-68. <https://doi.org/10.1093/nar/2.10.1653>.
- Eckel-Mahan, Kristin, et Paolo Sassone-Corsi. 2013. « Metabolism and the Circadian Clock Converge ». *Physiological Reviews* 93 (1): 107-35. <https://doi.org/10.1152/physrev.00016.2012>.

- Egorova, K. S., O. M. Olenkina, et L. V. Olenina. 2010. « Lysine Methylation of Nonhistone Proteins Is a Way to Regulate Their Stability and Function ». *Biochemistry. Biokhimiia* 75 (5): 535-48. <https://doi.org/10.1134/s0006297910050019>.
- Evans, John C., Donald P. Huddler, Mark T. Hilgers, Gail Romanchuk, Rowena G. Matthews, et Martha L. Ludwig. 2004. « Structures of the N-Terminal Modules Imply Large Domain Motions during Catalysis by Methionine Synthase ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (11): 3729-36. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308082100>.
- Fang, Pu, Daqing Zhang, Zhongjian Cheng, Chenghui Yan, Xiaohua Jiang, Warren D. Kruger, Shu Meng, et al. 2014. « Hyperhomocysteinemia Potentiates Hyperglycemia-Induced Inflammatory Monocyte Differentiation and Atherosclerosis ». *Diabetes* 63 (12): 4275-90. <https://doi.org/10.2337/db14-0809>.
- Field, Martha S., Elena Kamynina, Olufunmilayo C. Agunloye, Rebecca P. Liebenthal, Simon G. Lamarre, Margaret E. Brosnan, John T. Brosnan, et Patrick J. Stover. 2014. « Nuclear Enrichment of Folate Cofactors and Methylenetetrahydrofolate Dehydrogenase 1 (MTHFD1) Protect de Novo Thymidylate Biosynthesis during Folate Deficiency ». *The Journal of Biological Chemistry* 289 (43): 29642-50. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.599589>.
- Field, Martha S., Elena Kamynina, James Chon, et Patrick J. Stover. 2018a. « Nuclear Folate Metabolism ». *Annual Review of Nutrition* 38 (1): 219-43. <https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-071714-034441>.
- Finkelstein, J. D., et J. J. Martin. 2000. « Homocysteine ». *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 32 (4): 385-89. [https://doi.org/10.1016/s1357-2725\(99\)00138-7](https://doi.org/10.1016/s1357-2725(99)00138-7).
- Finkelstein, James D. 2007. « Metabolic Regulatory Properties of S-Adenosylmethionine and S-Adenosylhomocysteine ». *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 45 (12): 1694-99. <https://doi.org/10.1515/CCLM.2007.341>.
- Fischer, Sabine, Martina Huemer, Matthias Baumgartner, Federica Deodato, Diana Ballhausen, Avihu Boneh, Alberto B. Burlina, et al. 2014. « Clinical Presentation and Outcome in a Series of 88 Patients with the cblC Defect ». *Journal of Inherited Metabolic Disease* 37 (5): 831-40. <https://doi.org/10.1007/s10545-014-9687-6>.
- Fofou-Caillierez, Ma'atem B., Nadir T. Mrabet, Céline Chéry, Natacha Dreumont, Justine Flayac, Mihaela Pupavac, Justine Paoli, et al. 2013. « Interaction between Methionine Synthase Isoforms and MMACHC: Characterization in cblG-Variant, cblG and cblC Inherited Causes of Megaloblastic Anaemia ». *Human Molecular Genetics* 22 (22): 4591-4601. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt308>.
- Fox, Jennifer T., et Patrick J. Stover. 2008. « Folate-Mediated One-Carbon Metabolism ». *Vitamins and Hormones* 79:1-44. [https://doi.org/10.1016/S0083-6729\(08\)00401-9](https://doi.org/10.1016/S0083-6729(08)00401-9).
- Franco, Carolina N., Laurence J. Seabrook, Steven T. Nguyen, Jack T. Leonard, et Lauren V. Albrecht. 2022. « Simplifying the B Complex: How Vitamins B6 and B9 Modulate One Carbon Metabolism in Cancer and Beyond ». *Metabolites* 12 (10): 961. <https://doi.org/10.3390/metabo12100961>.
- Franken, D. G., H. J. Blom, G. H. Boers, A. Tangerman, C. M. Thomas, et F. J. Trijbels. 1996. « Thiamine (Vitamin B1) Supplementation Does Not Reduce Fasting Blood Homocysteine Concentration in Most Homozygotes for Homocystinuria ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1317 (2): 101-4. [https://doi.org/10.1016/s0925-4439\(96\)00033-6](https://doi.org/10.1016/s0925-4439(96)00033-6).

- Froese, D. Sean, Brian Fowler, et Matthias R. Baumgartner. 2019. « Vitamin B₁₂, Folate, and the Methionine Remethylation Cycle—Biochemistry, Pathways, and Regulation ». *Journal of Inherited Metabolic Disease* 42 (4): 673-85. <https://doi.org/10.1002/jimd.12009>.
- Froese, D. Sean, et Roy A. Gravel. 2010. « Genetic Disorders of Vitamin B₁₂ Metabolism: Eight Complementation Groups – Eight Genes ». *Expert Reviews in Molecular Medicine* 12 (novembre):e37. <https://doi.org/10.1017/S1462399410001651>.
- Ganguly, Paul, et Sreyoshi Fatima Alam. 2015. « Role of Homocysteine in the Development of Cardiovascular Disease ». *Nutrition Journal* 14 (janvier):6. <https://doi.org/10.1186/1475-2891-14-6>.
- Garcia, Maira Moreno, Rosa-Maria Guéant-Rodriguez, Shabnam Pooya, Patrick Brachet, Jean-Marc Alberto, Elise Jeannesson, Fathia Maskali, et al. 2011. « Methyl Donor Deficiency Induces Cardiomyopathy through Altered Methylation/Acetylation of PGC-1 α by PRMT1 and SIRT1 ». *The Journal of Pathology* 225 (3): 324-35. <https://doi.org/10.1002/path.2881>.
- Garrido, Francisco, María Gasset, Juliana Sanz-Aparicio, Carlos Alfonso, et María A. Pajares. 2005. « Rat Liver Betaine-Homocysteine S-Methyltransferase Equilibrium Unfolding: Insights into Intermediate Structure through Tryptophan Substitutions ». *The Biochemical Journal* 391 (Pt 3): 589-99. <https://doi.org/10.1042/BJ20050505>.
- George Hoyt Whipple. 1935. « Problems in anemia ». *Bulletin of the New York Academy of Medicine*, décembre, 321-22.
- Ghemrawi, R., S. Pooya, S. Lorentz, G. Gauchotte, C. Arnold, J.-L. Gueant, et S.-F. Battaglia-Hsu. 2013. « Decreased Vitamin B₁₂ Availability Induces ER Stress through Impaired SIRT1-Deacetylation of HSF1 ». *Cell Death & Disease* 4 (3): e553. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.69>.
- Ghemrawi, Rose, Carole Arnold, Shyue-Fang Battaglia-Hsu, Grégory Pourié, Isabelle Trinh, Christine Bassila, Charif Rashka, et al. 2019. « SIRT1 Activation Rescues the Mislocalization of RNA-Binding Proteins and Cognitive Defects Induced by Inherited Cobalamin Disorders ». *Metabolism: Clinical and Experimental* 101 (décembre):153992. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2019.153992>.
- Gomes, Ana P., Nathan L. Price, Alvin J.Y. Ling, Javid J. Moslehi, Magdalene K. Montgomery, Luis Rajman, James P. White, et al. 2013. « Declining NAD⁺ Induces a Pseudohypoxic State Disrupting Nuclear-Mitochondrial Communication during Aging ». *Cell* 155 (7): 1624-38. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.11.037>.
- González, J. C., K. Peariso, J. E. Penner-Hahn, et R. G. Matthews. 1996. « Cobalamin-Independent Methionine Synthase from Escherichia Coli: A Zinc Metalloenzyme ». *Biochemistry* 35 (38): 12228-34. <https://doi.org/10.1021/bi9615452>.
- Goodman, S. I., P. G. Moe, K. B. Hammond, S. H. Mudd, et B. W. Uhlenhuth. 1970. « Homocystinuria with Methylmalonic Aciduria: Two Cases in a Sibship ». *Biochemical Medicine* 4 (5): 500-515. [https://doi.org/10.1016/0006-2944\(70\)90080-3](https://doi.org/10.1016/0006-2944(70)90080-3).
- Gräsbeck, Ralph. 2006. « Imlerslund-Gräsbeck Syndrome (Selective Vitamin B₁₂ Malabsorption with Proteinuria) ». *Orphanet Journal of Rare Diseases* 1 (mai):17. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-1-17>.
- Grbeša, Ivana, Alon Kalo, Robert Belužić, Lucija Kovačević, Adriana Lepur, Filip Rokić, Hodaya Hochberg, et al. 2017. « Mutations in S-Adenosylhomocysteine Hydrolase (AHCY) Affect Its Nucleocytoplasmic Distribution and Capability to Interact with S-

- Adenosylhomocysteine Hydrolase-like 1 Protein ». *European Journal of Cell Biology* 96 (6): 579-90. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2017.05.002>.
- Greco, Carolina Magdalen, Marlene Cervantes, Jean-Michel Fustin, Kakeru Ito, Nicholas Ceglia, Muntaha Samad, Jiejun Shi, et al. 2020. « S-Adenosyl- L -Homocysteine Hydrolase Links Methionine Metabolism to the Circadian Clock and Chromatin Remodeling ». *Science Advances* 6 (51): eabc5629. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abc5629>.
- Green, Ralph, Lindsay H. Allen, Anne-Lise Bjørke-Monsen, Alex Brito, Jean-Louis Guéant, Joshua W. Miller, Anne M. Molloy, et al. 2017a. « Vitamin B12 Deficiency ». *Nature Reviews. Disease Primers* 3 (juin):17040. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.40>.
- Grillo, M. A., et S. Colombatto. 2008. « S-Adosylmethionine and Its Products ». *Amino Acids* 34 (2): 187-93. <https://doi.org/10.1007/s00726-007-0500-9>.
- Gruber, Karl, et Christoph Kratky. 2006. « Cobalamin-Dependent Methionine Synthase ». In *Handbook of Metalloproteins*. John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/0470028637.met173>.
- Guéant, J. L., C. Chéry, et F. Namour. 2001. « Cublin and the Hydrophobic Intrinsic Factor Receptor Are Distinct Molecules ». *Blood* 97 (10): 3316-17. <https://doi.org/10.1182/blood.v97.10.3316>.
- Guéant, Jean-Louis, Céline Chéry, Abderrahim Oussalah, Javad Nadaf, David Coelho, Thomas Josse, Justine Flayac, et al. 2018. « APRDX1 Mutant Allele Causes a MMACHC Secondary Epimutation in cblC Patients ». *Nature Communications* 9 (1): 67. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02306-5>.
- Guéant, Jean-louis, David Coelho, et Jean-Pierre Nicolas. 2014. « [Vitamin B12 and related genetic disorders] ». *Bulletin De l'Academie Nationale De Medecine* 198 (6): 1141-56.
- Guéant, Jean-Louis, Rania Elakoum, Olivier Ziegler, David Coelho, Eva Feigerlova, Jean-Luc Daval, et Rosa-Maria Guéant-Rodriguez. 2014. « Nutritional Models of Foetal Programming and Nutrigenomic and Epigenomic Dysregulations of Fatty Acid Metabolism in the Liver and Heart ». *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 466 (5): 833-50. <https://doi.org/10.1007/s00424-013-1339-4>.
- Guéant, Jean-Louis, Rosa-Maria Guéant-Rodriguez, et David H. Alpers. 2022. « Vitamin B12 Absorption and Malabsorption ». *Vitamins and Hormones* 119:241-74. <https://doi.org/10.1016/bs.vh.2022.01.016>.
- Guéant, Jean-Louis, Rosa-Maria Guéant-Rodriguez, Viola J. Kosgei, et David Coelho. 2022. « Causes and Consequences of Impaired Methionine Synthase Activity in Acquired and Inherited Disorders of Vitamin B₁₂ Metabolism ». *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 57 (2): 133-55. <https://doi.org/10.1080/10409238.2021.1979459>.
- Guéant, Jean-Louis, Fares Namour, Rosa-Maria Guéant-Rodriguez, et Jean-Luc Daval. 2013. « Folate and Fetal Programming: A Play in Epigenomics? ». *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM* 24 (6): 279-89. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2013.01.010>.
- Gulati, S., P. Baker, Y. N. Li, B. Fowler, W. Kruger, L. C. Brody, et R. Banerjee. 1996. « Defects in Human Methionine Synthase in cblG Patients ». *Human Molecular Genetics* 5 (12): 1859-65. <https://doi.org/10.1093/hmg/5.12.1859>.
- Gut, Philipp, et Eric Verdin. 2013. « The Nexus of Chromatin Regulation and Intermediary Metabolism ». *Nature* 502 (7472): 489-98. <https://doi.org/10.1038/nature12752>.
- Halsted, Charles H., Jesus A. Villanueva, Angela M. Devlin, Onni Niemelä, Seppo Parkkila, Timothy A. Garrow, Lynn M. Wallock, Mark K. Shigenaga, Stepan Melnyk, et S. Jill James. 2002. « Folate Deficiency Disturbs Hepatic Methionine Metabolism and Promotes Liver Injury in the Ethanol-Fed Micropig ». *Proceedings of the National*

- Academy of Sciences of the United States of America* 99 (15): 10072-77. <https://doi.org/10.1073/pnas.112336399>.
- Hao, Xiujuan, Min Zhou, Huijun Li, et Isaac A. Angres. 2017. « Novel Immunoassays to Detect Methionine Adenosyltransferase Activity and Quantify S-Adenosylmethionine ». *FEBS Letters* 591 (8): 1114-25. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12631>.
- Harte, R. A., B. F. Chow, et L. Barrows. 1953. « Storage and Elimination of Vitamin B12 in the Rat ». *The Journal of Nutrition* 49 (4): 669-78. <https://doi.org/10.1093/jn/49.4.669>.
- Hay, Ronald T. 2005. « SUMO ». *Molecular Cell* 18 (1): 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.03.012>.
- Hermann, Anton, et Guzel Sitdikova. 2021. « Homocysteine: Biochemistry, Molecular Biology and Role in Disease ». *Biomolecules* 11 (5): 737. <https://doi.org/10.3390/biom11050737>.
- Hirata, F., et J. Axelrod. 1980. « Phospholipid Methylation and Biological Signal Transmission ». *Science (New York, N.Y.)* 209 (4461): 1082-90. <https://doi.org/10.1126/science.6157192>.
- Hodgkin, D. C., J. Kamper, M. Mackay, J. Pickworth, K. N. Trueblood, et J. G. White. 1956. « Structure of Vitamin B12 ». *Nature* 178 (4524): 64-66. <https://doi.org/10.1038/178064a0>.
- Holliday, R., et J. E. Pugh. 1975. « DNA Modification Mechanisms and Gene Activity during Development ». *Science (New York, N.Y.)* 187 (4173): 226-32.
- Hong, Shangyu, Bo Zhai, et Pavlos Pissios. 2018. « Nicotinamide N-Methyltransferase Interacts with Enzymes of the Methionine Cycle and Regulates Methyl Donor Metabolism ». *Biochemistry* 57 (40): 5775-79. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.8b00561>.
- Hotchkiss, R. D. 1948. « The Quantitative Separation of Purines, Pyrimidines, and Nucleosides by Paper Chromatography ». *The Journal of Biological Chemistry* 175 (1): 315-32.
- Houtkooper, Riekelt H., Carles Cantó, Ronald J. Wanders, et Johan Auwerx. 2010. « The Secret Life of NAD⁺: An Old Metabolite Controlling New Metabolic Signaling Pathways ». *Endocrine Reviews* 31 (2): 194-223. <https://doi.org/10.1210/er.2009-0026>.
- Hrubša, Marcel, Tomáš Siatka, Iveta Nejmanová, Marie Vopršalová, Lenka Kujovská Krčmová, Kateřina Matoušová, Lenka Javorská, et al. 2022. « Biological Properties of Vitamins of the B-Complex, Part 1: Vitamins B1, B2, B3, and B5 ». *Nutrients* 14 (3): 484. <https://doi.org/10.3390/nu14030484>.
- Hu, Lun, Xiaojuan Wang, Yu-An Huang, Pengwei Hu, et Zhu-Hong You. 2021. « A Survey on Computational Models for Predicting Protein-Protein Interactions ». *Briefings in Bioinformatics* 22 (5): bbab036. <https://doi.org/10.1093/bib/bbab036>.
- Huemer, M., C. Bürer, P. Ješina, V. Kožich, M. A. Landolt, T. Suormala, B. Fowler, 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 ». *Journal of Inherited Metabolic Disease* 38 (5): 957-67. <https://doi.org/10.1007/s10545-014-9803-7>.
- Huemer, Martina, et Matthias R. Baumgartner. 2019. « The Clinical Presentation of Cobalamin-Related Disorders: From Acquired Deficiencies to Inborn Errors of Absorption and Intracellular Pathways ». *Journal of Inherited Metabolic Disease* 42 (4): 686-705. <https://doi.org/10.1002/jimd.12012>.
- Huemer, Martina, Daria Diodato, Bernd Schwahn, Manuel Schiff, Anabela Bandeira, Jean-Francois Benoist, Alberto Burlina, et al. 2017. « Guidelines for Diagnosis and Management of the Cobalamin-Related Remethylation Disorders cblC, cblD, cblE, cblF,

- cbIG, cbIJ and MTHFR Deficiency ». *Journal of Inherited Metabolic Disease* 40 (1): 21-48. <https://doi.org/10.1007/s10545-016-9991-4>.
- Hyllus, Dawin, Claudia Stein, Kristin Schnabel, Emile Schiltz, Axel Imhof, Yali Dou, James Hsieh, et Uta-Maria Bauer. 2007. « PRMT6-Mediated Methylation of R2 in Histone H3 Antagonizes H3 K4 Trimethylation ». *Genes & Development* 21 (24): 3369-80. <https://doi.org/10.1101/gad.447007>.
- Igarashi, Kazuhiko, et Yasutake Katoh. 2013. « Metabolic Aspects of Epigenome: Coupling of S-Adenosylmethionine Synthesis and Gene Regulation on Chromatin by SAMIT Module ». *Sub-Cellular Biochemistry* 61:105-18. https://doi.org/10.1007/978-94-007-4525-4_5.
- Inoue, Katsuhisa, Yasuhiro Nakai, Sayaka Ueda, Shunsuke Kamigaso, Kin-ya Ohta, Mai Hatakeyama, Yayoi Hayashi, Masaki Otagiri, et Hiroaki Yuasa. 2008. « Functional Characterization of PCFT/HCP1 as the Molecular Entity of the Carrier-Mediated Intestinal Folate Transport System in the Rat Model ». *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 294 (3): G660-68. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00309.2007>.
- Inoue-Choi, Maki, Heather H. Nelson, Kim Robien, Erland Arning, Teodoro Bottiglieri, Woon-Puay Koh, et Jian-Min Yuan. 2012. « One-Carbon Metabolism Nutrient Status and Plasma S-Adenosylmethionine Concentrations in Middle-Aged and Older Chinese in Singapore ». *International Journal of Molecular Epidemiology and Genetics* 3 (2): 160-73.
- Jamaluddin, M. D. S., Irene Chen, Fan Yang, Xiaohua Jiang, Michael Jan, Xiaoming Liu, Andrew I. Schafer, William Durante, Xiaofeng Yang, et Hong Wang. 2007. « Homocysteine Inhibits Endothelial Cell Growth via DNA Hypomethylation of the Cyclin A Gene ». *Blood* 110 (10): 3648-55. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-06-096701>.
- Jensen, Majken K., Monica L. Bertoia, Leah E. Cahill, Isha Agarwal, Eric B. Rimm, et Kenneth J. Mukamal. 2014. « Novel Metabolic Biomarkers of Cardiovascular Disease ». *Nature Reviews. Endocrinology* 10 (11): 659-72. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2014.155>.
- Jonkhout, Nicky, Julia Tran, Martin A. Smith, Nicole Schonrock, John S. Mattick, et Eva Maria Novoa. 2017. « The RNA Modification Landscape in Human Disease ». *RNA (New York, N.Y.)* 23 (12): 1754-69. <https://doi.org/10.1261/rna.063503.117>.
- Jurkowska, Renata Zofia, Tomasz Piotr Jurkowski, et Albert Jeltsch. 2011. « Structure and Function of Mammalian DNA Methyltransferases ». *Chembiochem: A European Journal of Chemical Biology* 12 (2): 206-22. <https://doi.org/10.1002/cbic.201000195>.
- Kabil, Omer, You Zhou, et Ruma Banerjee. 2006. « Human Cystathionine Beta-Synthase Is a Target for Sumoylation ». *Biochemistry* 45 (45): 13528-36. <https://doi.org/10.1021/bi0615644>.
- Katoh, Yasutake, Tsuyoshi Ikura, Yutaka Hoshikawa, Satoshi Tashiro, Takashi Ito, Mineto Ohta, Yohei Kera, Tetsuo Noda, et Kazuhiko Igarashi. 2011. « Methionine Adenosyltransferase II Serves as a Transcriptional Corepressor of Maf Oncoprotein ». *Molecular Cell* 41 (5): 554-66. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.02.018>.
- Katz, M. L., J. S. Christianson, N. E. Norbury, C. L. Gao, A. N. Siakotos, et N. Koppang. 1994. « Lysine Methylation of Mitochondrial ATP Synthase Subunit c Stored in Tissues of Dogs with Hereditary Ceroid Lipofuscinosis ». *The Journal of Biological Chemistry* 269 (13): 9906-11.
- Kennedy, E. P., et S. B. Weiss. 1956. « The Function of Cytidine Coenzymes in the Biosynthesis of Phospholipides ». *The Journal of Biological Chemistry* 222 (1): 193-214.

- Kera, Yohei, Yasutake Katoh, Mineto Ohta, Mitsuyo Matsumoto, Teruko Takano-Yamamoto, et Kazuhiko Igarashi. 2013. « Methionine Adenosyltransferase II-Dependent Histone H3K9 Methylation at the COX-2 Gene Locus ». *The Journal of Biological Chemistry* 288 (19): 13592-601. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.429738>.
- Kitai, Katsuki, Kosuke Kawaguchi, Takenori Tomohiro, Masashi Morita, Takanori So, et Tsuneo Imanaka. 2021. « The Lysosomal Protein ABCD4 Can Transport Vitamin B12 across Liposomal Membranes in Vitro ». *The Journal of Biological Chemistry* 296:100654. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100654>.
- Kloor, Doris, Marina Hermes, Katrin Fink, Heide Schmid, Karin Klingel, Andreas Mack, Almut Grenz, et Hartmut Osswald. 2007. « Expression and Localization of S-Adenosylhomocysteine-Hydrolase in the Rat Kidney Following Carbon Monoxide Induced Hypoxia ». *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology* 19 (1-4): 57-66. <https://doi.org/10.1159/000099192>.
- Kornberg, R. D. 1974. « Chromatin Structure: A Repeating Unit of Histones and DNA ». *Science (New York, N.Y.)* 184 (4139): 868-71. <https://doi.org/10.1126/science.184.4139.868>.
- Kotlyar, Max, Chiara Pastrello, Flavia Pivetta, Alessandra Lo Sardo, Christian Cumbaa, Han Li, Taline Naranian, et al. 2015. « In Silico Prediction of Physical Protein Interactions and Characterization of Interactome Orphans ». *Nature Methods* 12 (1): 79-84. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3178>.
- Koutmos, Markos, Supratim Datta, Katherine A. Patridge, Janet L. Smith, et Rowena G. Matthews. 2009. « Insights into the Reactivation of Cobalamin-Dependent Methionine Synthase ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (44): 18527-32. <https://doi.org/10.1073/pnas.0906132106>.
- Kozbial, Piotr Z., et Arcady R. Mushegian. 2005. « Natural History of S-Adenosylmethionine-Binding Proteins ». *BMC Structural Biology* 5 (octobre):19. <https://doi.org/10.1186/1472-6807-5-19>.
- Kresge, Nicole, Robert D. Simoni, et Robert L. Hill. 2004. « A Trail of Research in Sulfur Chemistry and Metabolism: The Work of Vincent Du Vigneaud ». *Journal of Biological Chemistry* 279 (51): 112-15. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)82037-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)82037-3).
- Kruh, Gary D, et Martin G Belinsky. 2003. « The MRP Family of Drug Efflux Pumps ». *Oncogene* 22 (47): 7537-52. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206953>.
- Kunizaki, Masaki, Ryuji Hamamoto, Fabio Pittella Silva, Kiyoshi Yamaguchi, Takeshi Nagayasu, Masabumi Shibuya, Yusuke Nakamura, et Yoichi Furukawa. 2007. « The Lysine 831 of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1 Is a Novel Target of Methylation by SMYD3 ». *Cancer Research* 67 (22): 10759-65. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-1132>.
- Lachner, M., D. O'Carroll, S. Rea, K. Mechtler, et T. Jenuwein. 2001. « Methylation of Histone H3 Lysine 9 Creates a Binding Site for HP1 Proteins ». *Nature* 410 (6824): 116-20. <https://doi.org/10.1038/35065132>.
- Lapko, Veniamin N., Ronald L. Cerny, David L. Smith, et Jean B. Smith. 2005. « Modifications of Human betaA1/betaA3-Crystallins Include S-Methylation, Glutathiolation, and Truncation ». *Protein Science: A Publication of the Protein Society* 14 (1): 45-54. <https://doi.org/10.1110/ps.04738505>.
- Larsson, J., J. Zhang, et A. Rasmuson-Lestander. 1996. « Mutations in the Drosophila Melanogaster Gene Encoding S-Adenosylmethionine Synthetase [Corrected] Suppress

- Position-Effect Variegation ». *Genetics* 143 (2): 887-96. <https://doi.org/10.1093/genetics/143.2.887>.
- Ledley, F. D., M. R. Lumetta, H. Y. Zoghbi, P. VanTuinen, S. A. Ledbetter, et D. H. Ledbetter. 1988. « Mapping of Human Methylmalonyl CoA Mutase (MUT) Locus on Chromosome 6 ». *American Journal of Human Genetics* 42 (6): 839-46.
- Lee, Yoonjin, John E. Dominy, Yoon Jong Choi, Michael Jurczak, Nicola Tolliday, Joao Paulo Camporez, Helen Chim, et al. 2014. « Cyclin D1–Cdk4 Controls Glucose Metabolism Independently of Cell Cycle Progression ». *Nature* 510 (7506): 547-51. <https://doi.org/10.1038/nature13267>.
- Lerner-Ellis, Jordan P., C. Melissa Dobson, Timothy Wai, David Watkins, Jamie C. Tirone, Daniel Leclerc, Carole Doré, Pierre Lepage, Roy A. Gravel, et David S. Rosenblatt. 2004. « Mutations in the MMAA Gene in Patients with the cblA Disorder of Vitamin B12 Metabolism ». *Human Mutation* 24 (6): 509-16. <https://doi.org/10.1002/humu.20104>.
- Lerner-Ellis, Jordan P., Jamie C. Tirone, Peter D. Pawelek, Carole Doré, Janet L. Atkinson, David Watkins, Chantal F. Morel, et al. 2006. « Identification of the Gene Responsible for Methylmalonic Aciduria and Homocystinuria, cblC Type ». *Nature Genetics* 38 (1): 93-100. <https://doi.org/10.1038/ng1683>.
- Li, En, et Yi Zhang. 2014. « DNA Methylation in Mammals ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 6 (5): a019133. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019133>.
- Li, Jiayu, Yanguo Xin, Jingye Li, Hui Chen, et Hongwei Li. 2023. « Phosphatidylethanolamine N-Methyltransferase: From Functions to Diseases ». *Aging and Disease* 14 (3): 879-91. <https://doi.org/10.14336/AD.2022.1025>.
- Li, Shanshan, Selene K. Swanson, Madelaine Gogol, Laurence Florens, Michael P. Washburn, Jerry L. Workman, et Tamaki Sukanuma. 2015. « Serine and SAM Responsive Complex SESAME Regulates Histone Modification Crosstalk by Sensing Cellular Metabolism ». *Molecular Cell* 60 (3): 408-21. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.09.024>.
- Lin, B. F., R. F. Huang, et B. Shane. 1993. « Regulation of Folate and One-Carbon Metabolism in Mammalian Cells. III. Role of Mitochondrial Folylpolo-Gamma-Glutamate Synthetase ». *The Journal of Biological Chemistry* 268 (29): 21674-79.
- Liu, Congshan, Jianping Cao, Haobing Zhang, et Jianhai Yin. 2022. « Evolutionary History of RNA Modifications at N6-Adenosine Originating from the R-M System in Eukaryotes and Prokaryotes ». *Biology* 11 (2): 214. <https://doi.org/10.3390/biology11020214>.
- Lopez, Michael J., et Shamim S. Mohiuddin. 2023. « Biochemistry, Essential Amino Acids ». In *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557845/>.
- Lowenstein, L., L. Brunton, et Y. S. Hsieh. 1966. « Nutritional Anemia and Megaloblastosis in Pregnancy ». *Canadian Medical Association Journal* 94 (13): 636-45.
- Luo, Yuhong, Juan Feng, Qingbo Xu, Wengong Wang, et Xian Wang. 2016. « NSun2 Deficiency Protects Endothelium From Inflammation via mRNA Methylation of ICAM-1 ». *Circulation Research* 118 (6): 944-56. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.307674>.
- Lyon, Peter, Victoria Strippoli, Byron Fang, et Luisa Cimmino. 2020. « B Vitamins and One-Carbon Metabolism: Implications in Human Health and Disease ». *Nutrients* 12 (9): 2867. <https://doi.org/10.3390/nu12092867>.
- Ma, Junfeng, et Gerald W. Hart. 2014. « O-GlcNAc Profiling: From Proteins to Proteomes ». *Clinical Proteomics* 11 (1): 8. <https://doi.org/10.1186/1559-0275-11-8>.

- Markham, G. D., et M. A. Pajares. 2009. « Structure-Function Relationships in Methionine Adenosyltransferases ». *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 66 (4): 636-48. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8516-1>.
- Mascarenhas, Romila, Arkajit Guha, Zhu Li, Markus Ruetz, Sojin An, Javier Seravalli, et Ruma Banerjee. 2023. « Cobalt-Sulfur Coordination Chemistry Drives B12 Loading onto Methionine Synthase ». *Journal of the American Chemical Society*, novembre. <https://doi.org/10.1021/jacs.3c07941>.
- Matherly, Larry H, et I. David Goldman. 2003. « Membrane Transport of Folates ». In *Vitamins & Hormones*, 66:403-56. Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0083-6729\(03\)01012-4](https://doi.org/10.1016/S0083-6729(03)01012-4).
- Matmat, Karim, Jean-Baptiste Conart, Paul-Henri Graindorge, Sandra El Kouche, Ziad Hassan, Youssef Sibli, Rémy Umoret, et al. 2024. « Correction: A Transgenic Mice Model of Retinopathy of cblG-type Inherited Disorder of One-carbon Metabolism Highlights Epigenome-wide Alterations Related to Cone Photoreceptor Cells Development and Retinal Metabolism ». *Clinical Epigenetics* 16 (1): 23. <https://doi.org/10.1186/s13148-024-01636-8>.
- Mato, J. M., L. Alvarez, P. Ortiz, et M. A. Pajares. 1997. « S-Adenosylmethionine Synthesis: Molecular Mechanisms and Clinical Implications ». *Pharmacology & Therapeutics* 73 (3): 265-80. [https://doi.org/10.1016/s0163-7258\(96\)00197-0](https://doi.org/10.1016/s0163-7258(96)00197-0).
- Mattocks, Dwight A.L., Samantha J. Mentch, Jelena Shneyder, Gene P. Ables, Dongxiao Sun, John P. Richie, Jason W. Locasale, et Sailendra N. Nichenametla. 2017. « Short Term Methionine Restriction Increases Hepatic Global DNA Methylation in Adult but Not Young Male C57BL/6J Mice ». *Experimental Gerontology* 88 (février):1-8. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2016.12.003>.
- McCorvie, Thomas J., Douglas Ferreira, Wyatt W. Yue, et D. Sean Froese. 2023. « The Complex Machinery of Human Cobalamin Metabolism ». *Journal of Inherited Metabolic Disease* 46 (3): 406-20. <https://doi.org/10.1002/jimd.12593>.
- McMillan, J. M., U. K. Walle, et T. Walle. 2005. « S-Adenosyl-L-Methionine: Transcellular Transport and Uptake by Caco-2 Cells and Hepatocytes ». *The Journal of Pharmacy and Pharmacology* 57 (5): 599-605. <https://doi.org/10.1211/0022357056082>.
- Mentch, Samantha J., Mahya Mehrmohamadi, Lei Huang, Xiaojing Liu, Diwakar Gupta, Dwight Mattocks, Paola Gómez Padilla, et al. 2015. « Histone Methylation Dynamics and Gene Regulation Occur through the Sensing of One-Carbon Metabolism ». *Cell Metabolism* 22 (5): 861-73. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.08.024>.
- Mews, Philipp, Greg Donahue, Adam M. Drake, Vincent Luczak, Ted Abel, et Shelley L. Berger. 2017. « Acetyl-CoA Synthetase Regulates Histone Acetylation and Hippocampal Memory ». *Nature* 546 (7658): 381-86. <https://doi.org/10.1038/nature22405>.
- Mikkelsen, Tarjei S., Manching Ku, David B. Jaffe, Biju Issac, Erez Lieberman, Georgia Giannoukos, Pablo Alvarez, et al. 2007. « Genome-Wide Maps of Chromatin State in Pluripotent and Lineage-Committed Cells ». *Nature* 448 (7153): 553-60. <https://doi.org/10.1038/nature06008>.
- Miller, M. W., D. M. Duhl, B. M. Winkes, F. Arredondo-Vega, P. J. Saxon, G. L. Wolff, C. J. Epstein, M. S. Hershfield, et G. S. Barsh. 1994. « The Mouse Lethal Nonagouti (a(x)) Mutation Deletes the S-Adenosylhomocysteine Hydrolase (AHCY) Gene ». *The EMBO Journal* 13 (8): 1806-16. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1994.tb06449.x>.
- Mills, J. L., J. M. Scott, P. N. Kirke, J. M. McPartlin, M. R. Conley, D. G. Weir, A. M. Molloy, et Y. J. Lee. 1996. « Homocysteine and Neural Tube Defects ». *The Journal of Nutrition* 126 (3): 756S-760S. https://doi.org/10.1093/jn/126.suppl_3.756S.

- Mitchell, Herschel K., Esmond E. Snell, et Roger J. Williams. 1941. « THE CONCENTRATION OF "FOLIC ACID" ». *Nutrition Reviews* 46 (9): 324-25. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.1988.tb05473.x>.
- Moncada, Salvador, E. Annie Higgs, et Sergio L. Colombo. 2012. « Fulfilling the Metabolic Requirements for Cell Proliferation ». *Biochemical Journal* 446 (1): 1-7. <https://doi.org/10.1042/BJ20120427>.
- Moore, Lisa D., Thuc Le, et Guoping Fan. 2013. « DNA Methylation and Its Basic Function ». *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 38 (1): 23-38. <https://doi.org/10.1038/npp.2012.112>.
- Morris, John P., Jossie J. Yashinskie, Richard Koche, Rohit Chandwani, Sha Tian, Chi-Chao Chen, Timour Baslan, et al. 2019. « α -Ketoglutarate Links P53 to Cell Fate during Tumour Suppression ». *Nature* 573 (7775): 595-99. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1577-5>.
- Mosca, Pauline, Bruno Leheup, et Natacha Dreumont. 2019. « Nutrigenomics and RNA Methylation: Role of Micronutrients ». *Biochimie* 164 (septembre):53-59. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2019.07.008>.
- MRC Vitamin Study Research Group. 1991. « Prevention of Neural Tube Defects: Results of the Medical Research Council Vitamin Study. MRC Vitamin Study Research Group ». *Lancet (London, England)* 338 (8760): 131-37.
- Muratore, Christina R., Nathaniel W. Hodgson, Malav S. Trivedi, Hamid M. Abdolmaleky, Antonio M. Persico, Carla Lintas, Suzanne De la Monte, et Richard C. Deth. 2013. « Age-Dependent Decrease and Alternative Splicing of Methionine Synthase mRNA in Human Cerebral Cortex and an Accelerated Decrease in Autism ». *PloS One* 8 (2): e56927. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056927>.
- Nanney, D. L. 1958. « EPIGENETIC CONTROL SYSTEMS ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 44 (7): 712-17. <https://doi.org/10.1073/pnas.44.7.712>.
- Nicolas, J. P., et J. L. Guéant. 1994. « [Absorption, distribution and excretion of vitamin B12] ». *Annales De Gastroenterologie Et D'hepatologie* 30 (6): 270-76, 281; discussion 281-282.
- Nielsen, Marianne J., Mie R. Rasmussen, Christian B. F. Andersen, Ebba Nexø, et Søren K. Moestrup. 2012. « Vitamin B12 Transport from Food to the Body's Cells--a Sophisticated, Multistep Pathway ». *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology* 9 (6): 345-54. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2012.76>.
- Nimura, Keisuke, Kiyoe Ura, et Yasufumi Kaneda. 2010. « Histone Methyltransferases: Regulation of Transcription and Contribution to Human Disease ». *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)* 88 (12): 1213-20. <https://doi.org/10.1007/s00109-010-0668-4>.
- Nishimaki-Mogami, T., K. Suzuki, et A. Takahashi. 1996. « The Role of Phosphatidylethanolamine Methylation in the Secretion of Very Low Density Lipoproteins by Cultured Rat Hepatocytes: Rapid Inhibition of Phosphatidylethanolamine Methylation by Bezafibrate Increases the Density of Apolipoprotein B48-Containing Lipoproteins ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1304 (1): 21-31. [https://doi.org/10.1016/s0005-2760\(96\)00100-2](https://doi.org/10.1016/s0005-2760(96)00100-2).
- Ohrvik, Veronica E., et Cornelia M. Witthoft. 2011. « Human Folate Bioavailability ». *Nutrients* 3 (4): 475-90. <https://doi.org/10.3390/nu3040475>.

- Padovani, Dominique, et Ruma Banerjee. 2009. « A Rotary Mechanism for Coenzyme B(12) Synthesis by Adenosyltransferase ». *Biochemistry* 48 (23): 5350-57. <https://doi.org/10.1021/bi900454s>.
- Pajares, María A., et Dolores Pérez-Sala. 2018. « Mammalian Sulfur Amino Acid Metabolism: A Nexus Between Redox Regulation, Nutrition, Epigenetics, and Detoxification ». *Antioxidants & Redox Signaling* 29 (4): 408-52. <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7237>.
- Panetta, John Carl, Amelia Wall, Ching-Hon Pui, Mary V. Relling, et William E. Evans. 2002. « Methotrexate Intracellular Disposition in Acute Lymphoblastic Leukemia: A Mathematical Model of Gamma-Glutamyl Hydrolase Activity ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 8 (7): 2423-29.
- Pappenheimer, A. M. 1987. « John Howard Mueller: June 13, 1891-February 16, 1954 ». *Biographical Memoirs. National Academy of Sciences (U.S.)* 57:307-21.
- Park, Kiyong, et Thomas C. Brunold. 2013. « Combined Spectroscopic and Computational Analysis of the Vibrational Properties of Vitamin B₁₂ in Its Co³⁺, Co²⁺, and Co¹⁺ Oxidation States ». *The Journal of Physical Chemistry B* 117 (18): 5397-5410. <https://doi.org/10.1021/jp309392u>.
- Park, Sung Hee, José A. Reyes, David R. Gilbert, Ji Woong Kim, et Sangsoo Kim. 2009. « Prediction of Protein-Protein Interaction Types Using Association Rule Based Classification ». *BMC Bioinformatics* 10 (janvier):36. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-36>.
- Parker, Nikki, Mary Jo Turk, Elaine Westrick, Jeffrey D. Lewis, Philip S. Low, et Christopher P. Leamon. 2005. « Folate Receptor Expression in Carcinomas and Normal Tissues Determined by a Quantitative Radioligand Binding Assay ». *Analytical Biochemistry* 338 (2): 284-93. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2004.12.026>.
- Peixoto, Paul, Pierre-François Cartron, Aurélien A. Serandour, et Eric Hervouet. 2020. « From 1957 to Nowadays: A Brief History of Epigenetics ». *International Journal of Molecular Sciences* 21 (20): 7571. <https://doi.org/10.3390/ijms21207571>.
- Pendleton, Kathryn E., Beibei Chen, Kuanqing Liu, Olga V. Hunter, Yang Xie, Benjamin P. Tu, et Nicholas K. Conrad. 2017. « The U6 snRNA m⁶A Methyltransferase METTL16 Regulates SAM Synthetase Intron Retention ». *Cell* 169 (5): 824-835.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.003>.
- Pérez, Claudia, Francisco J. Pérez-Zúñiga, Francisco Garrido, Edel Reytor, Francisco Portillo, et María A. Pajares. 2016. « The Oncogene PDRG1 Is an Interaction Target of Methionine Adenosyltransferases ». *PLoS One* 11 (8): e0161672. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161672>.
- Pérez-Miguelsanz, Juliana, Néstor Vallecillo, Francisco Garrido, Edel Reytor, Dolores Pérez-Sala, et María A. Pajares. 2017a. « Betaine Homocysteine S-Methyltransferase Emerges as a New Player of the Nuclear Methionine Cycle ». *Biochimica Et Biophysica Acta. Molecular Cell Research* 1864 (7): 1165-82. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2017.03.004>.
- Plesa, Maria, Jaeseung Kim, Stéphane G. Paquette, Hubert Gagnon, Christopher Ng-Thow-Hing, Bernard F. Gibbs, Mark A. Hancock, David S. Rosenblatt, et James W. Coulton. 2011. « Interaction between MMACHC and MMADHC, Two Human Proteins Participating in Intracellular Vitamin B₁₂ Metabolism ». *Molecular Genetics and Metabolism* 102 (2): 139-48. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2010.10.011>.

- Polevoda, Bogdan, et Fred Sherman. 2007. « Methylation of Proteins Involved in Translation ». *Molecular Microbiology* 65 (3): 590-606. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05831.x>.
- Portillo, Francisco, Jesús Vázquez, et María A. Pajares. 2020. « Protein-Protein Interactions Involving Enzymes of the Mammalian Methionine and Homocysteine Metabolism ». *Biochimie* 173 (juin):33-47. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2020.02.015>.
- Price, Morgan N., Adam M. Deutschbauer, et Adam P. Arkin. 2021. « Four Families of Folate-Independent Methionine Synthases ». *PLoS Genetics* 17 (2): e1009342. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009342>.
- Pupavac, Mihaela, David Watkins, Francis Petrella, Somayyeh Fahiminiya, Alexandre Janer, Warren Cheung, Anne-Claude Gingras, et al. 2016. « Inborn Error of Cobalamin Metabolism Associated with the Intracellular Accumulation of Transcobalamin-Bound Cobalamin and Mutations in ZNF143, Which Codes for a Transcriptional Activator ». *Human Mutation* 37 (9): 976-82. <https://doi.org/10.1002/humu.23037>.
- Qiu, Andong, Michaela Jansen, Antoinette Sakaris, Sang Hee Min, Shrikanta Chattopadhyay, Eugenia Tsai, Claudio Sandoval, Rongbao Zhao, Myles H. Akabas, et I. David Goldman. 2006. « Identification of an Intestinal Folate Transporter and the Molecular Basis for Hereditary Folate Malabsorption ». *Cell* 127 (5): 917-28. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.09.041>.
- Quadros, Edward V., Shao-Chiang Lai, Yasumi Nakayama, Jeffrey M. Sequeira, Luciana Hannibal, Sihe Wang, Donald W. Jacobsen, et al. 2010. « Positive Newborn Screen for Methylmalonic Aciduria Identifies the First Mutation in TCbIR/CD320, the Gene for Cellular Uptake of Transcobalamin-Bound Vitamin B(12) ». *Human Mutation* 31 (8): 924-29. <https://doi.org/10.1002/humu.21297>.
- Quadros, Edward V., Yasumi Nakayama, et Jeffrey M. Sequeira. 2009. « The Protein and the Gene Encoding the Receptor for the Cellular Uptake of Transcobalamin-Bound Cobalamin ». *Blood* 113 (1): 186-92. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-05-158949>.
- . 2013. « Saporin Conjugated Monoclonal Antibody to the Transcobalamin Receptor TCbIR/CD320 Is Effective in Targeting and Destroying Cancer Cells ». *Journal of Cancer Therapy* 4 (6): 1074-81. <https://doi.org/10.4236/jct.2013.46122>.
- Quinlivan, Eoin P., Steven R. Davis, Karla P. Shelnut, George N. Henderson, Haifa Ghandour, Barry Shane, Jacob Selhub, Lynn B. Bailey, Peter W. Stacpoole, et Jesse F. Gregory. 2005. « Methylenetetrahydrofolate Reductase 677C->T Polymorphism and Folate Status Affect One-Carbon Incorporation into Human DNA Deoxynucleosides ». *The Journal of Nutrition* 135 (3): 389-96. <https://doi.org/10.1093/jn/135.3.389>.
- Quintana, Anita M., Hung-Chun Yu, Alison Brebner, Mihaela Pupavac, Elizabeth A. Geiger, Abigail Watson, Victoria L. Castro, et al. 2017. « Mutations in THAP11 Cause an Inborn Error of Cobalamin Metabolism and Developmental Abnormalities ». *Human Molecular Genetics* 26 (15): 2838-49. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddx157>.
- Radomski, N., C. Kaufmann, et C. Dreyer. 1999. « Nuclear Accumulation of S-Adenosylhomocysteine Hydrolase in Transcriptionally Active Cells during Development of *Xenopus Laevis* ». *Molecular Biology of the Cell* 10 (12): 4283-98. <https://doi.org/10.1091/mbc.10.12.4283>.
- Rashka, Charif, Sébastien Hergalant, Natacha Dreumont, Abderrahim Oussalah, Jean-Michel Camadro, Virginie Marchand, Ziad Hassan, et al. 2020. « Analysis of Fibroblasts from Patients with cblC and cblG Genetic Defects of Cobalamin Metabolism Reveals Global

- Dysregulation of Alternative Splicing ». *Human Molecular Genetics* 29 (12): 1969-85. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddaa027>.
- Reddy, J. A., L. S. Haneline, E. F. Srour, A. C. Antony, D. W. Clapp, et P. S. Low. 1999. « Expression and Functional Characterization of the Beta-Isoform of the Folate Receptor on CD34(+) Cells ». *Blood* 93 (11): 3940-48.
- Regec, A., E. V. Quadros, O. Platica, et S. P. Rothenberg. 1995. « The Cloning and Characterization of the Human Transcobalamin II Gene ». *Blood* 85 (10): 2711-19.
- Reinhardt, A., et T. Hubbard. 1998. « Using Neural Networks for Prediction of the Subcellular Location of Proteins ». *Nucleic Acids Research* 26 (9): 2230-36. <https://doi.org/10.1093/nar/26.9.2230>.
- Reubsæet, Frans A.G., Jacques H. Veerkamp, Marloes L.P. Brückwilder, J.M.Frans Trijbels, et Leo A.H. Monnens. 1991. « Peroxisomal Oxidases and Catalase in Liver and Kidney Homogenates of Normal and Di(Ethylhexyl)Phthalate-Fed Rats ». *International Journal of Biochemistry* 23 (9): 961-67. [https://doi.org/10.1016/0020-711X\(91\)90086-3](https://doi.org/10.1016/0020-711X(91)90086-3).
- Reynolds, Edward. 2006. « Vitamin B12, Folic Acid, and the Nervous System ». *The Lancet Neurology* 5 (11): 949-60. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(06\)70598-1](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(06)70598-1).
- Reytor, Edel, Juliana Pérez-Miguelsanz, Luis Alvarez, Dolores Pérez-Sala, et María A. Pajares. 2009. « Conformational Signals in the C-Terminal Domain of Methionine Adenosyltransferase I/III Determine Its Nucleocytoplasmic Distribution ». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 23 (10): 3347-60. <https://doi.org/10.1096/fj.09-130187>.
- Richard, Eva, Ana Jorge-Finnigan, Judit Garcia-Villoria, Begoña Merinero, Lourdes R. Desviat, Laura Gort, Paz Briones, et al. 2009. « Genetic and Cellular Studies of Oxidative Stress in Methylmalonic Aciduria (MMA) Cobalamin Deficiency Type C (cblC) with Homocystinuria (MMACHC) ». *Human Mutation* 30 (11): 1558-66. <https://doi.org/10.1002/humu.21107>.
- Rickes, Edward L., Norman G. Brink, Frank R. Koniuszy, Thomas R. Wood, et Karl Folkers. 1948. « Crystalline Vitamin B₁₂ ». *Science* 107 (2781): 396-97. <https://doi.org/10.1126/science.107.2781.396>.
- Robinson, Jason L., Renee K. Bartlett, Scott V. Harding, Edward W. Randell, Janet A. Brunton, et Robert F. Bertolo. 2016. « Dietary Methyl Donors Affect in Vivo Methionine Partitioning between Transmethylation and Protein Synthesis in the Neonatal Piglet ». *Amino Acids* 48 (12): 2821-30. <https://doi.org/10.1007/s00726-016-2317-x>.
- Rosenberg, Irwin H., Richard R. Streiff, Herman A. Godwin, et William B. Castle. 1969. « Absorption of Polyglutamic Folate: Participation of Deconjugating Enzymes of the Intestinal Mucosa ». *New England Journal of Medicine* 280 (18): 985-88. <https://doi.org/10.1056/NEJM196905012801804>.
- Rouillon, A., Y. Surdin-Kerjan, et D. Thomas. 1999. « Transport of Sulfonium Compounds. Characterization of the s-Adenosylmethionine and s-Methylmethionine Permeases from the Yeast *Saccharomyces Cerevisiae* ». *The Journal of Biological Chemistry* 274 (40): 28096-105. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.40.28096>.
- Roy, Dominic G., Jocelyn Chen, Victoria Mamane, Eric H. Ma, Brejnev M. Muhire, Ryan D. Sheldon, Tatiana Shorstova, et al. 2020. « Methionine Metabolism Shapes T Helper Cell Responses through Regulation of Epigenetic Reprogramming ». *Cell Metabolism* 31 (2): 250-266.e9. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.01.006>.
- Ruiz-Mercado, M., M. T. Vargas, I. Pérez de Soto, C. Delgado Pecellín, M. Conde Sánchez, M. A. Bueno Delgado, R. Bernal Ruiz, J. A. Pérez-Simón, et A. Herrera Díaz-Aguado. 2016.

- « Methionine Synthase Reductase Deficiency (CbIE): A Report of Two Patients and a Novel Mutation ». *Hematology (Amsterdam, Netherlands)* 21 (3): 193-97. <https://doi.org/10.1179/1607845415Y.0000000017>.
- Russell-Jones, G. J., et D. H. Alpers. 1999. « Vitamin B12 Transporters ». *Pharmaceutical Biotechnology* 12:493-520. https://doi.org/10.1007/0-306-46812-3_17.
- Ryu, Keun Woo, Tulip Nandu, Jiyeon Kim, Sridevi Challa, Ralph J. DeBerardinis, et W. Lee Kraus. 2018. « Metabolic Regulation of Transcription through Compartmentalized NAD⁺ Biosynthesis ». *Science* 360 (6389): eaan5780. <https://doi.org/10.1126/science.aan5780>.
- Sahu, Umakant, Vinod K. H. Rajendra, Shankar S. Kapnoor, Raghu Bhagavat, Nagasuma Chandra, et Pundi N. Rangarajan. 2017. « Methionine Synthase Is Localized to the Nucleus in *Pichia Pastoris* and *Candida Albicans* and to the Cytoplasm in *Saccharomyces Cerevisiae* ». *The Journal of Biological Chemistry* 292 (36): 14730-46. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.783019>.
- Salazar, Marcela D'Alincourt, et Manohar Ratnam. 2007. « The Folate Receptor: What Does It Promise in Tissue-Targeted Therapeutics? » *Cancer and Metastasis Reviews* 26 (1): 141-52. <https://doi.org/10.1007/s10555-007-9048-0>.
- Schnackenberg, Laura K., Minjun Chen, Jinchun Sun, Ricky D. Holland, Yvonne Dragan, Weida Tong, William Welsh, et Richard D. Beger. 2009. « Evaluations of the Trans-Sulfuration Pathway in Multiple Liver Toxicity Studies ». *Toxicology and Applied Pharmacology* 235 (1): 25-32. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2008.11.015>.
- Schwepppe, Devin K., Edward L. Huttlin, J. Wade Harper, et Steven P. Gygi. 2018. « BioPlex Display: An Interactive Suite for Large-Scale AP–MS Protein–Protein Interaction Data ». *Journal of Proteome Research* 17 (1): 722-26. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.7b00572>.
- Scott, John M. 1999. « Folate and Vitamin B₁₂ ». *Proceedings of the Nutrition Society* 58 (2): 441-48. <https://doi.org/10.1017/S0029665199000580>.
- Sekowska, Agnieszka, Hiroki Ashida, et Antoine Danchin. 2019. « Revisiting the Methionine Salvage Pathway and Its Paralogues ». *Microbial Biotechnology* 12 (1): 77-97. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13324>.
- Shafizadeh, Tracy B., et Charles H. Halsted. 2007. « γ -Glutamyl Hydrolase, Not Glutamate Carboxypeptidase II, Hydrolyzes Dietary Folate in Rat Small Intestine ». *The Journal of Nutrition* 137 (5): 1149-53. <https://doi.org/10.1093/jn/137.5.1149>.
- Shen, Wen, Chao Gao, Ramon Cueto, Lu Liu, Hangfei Fu, Ying Shao, William Y. Yang, et al. 2020a. « Homocysteine-Methionine Cycle Is a Metabolic Sensor System Controlling Methylation-Regulated Pathological Signaling ». *Redox Biology* 28 (janvier):101322. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101322>.
- Shi, Hailing, Jiangbo Wei, et Chuan He. 2019. « Where, When, and How: Context-Dependent Functions of RNA Methylation Writers, Readers, and Erasers ». *Molecular Cell* 74 (4): 640-50. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.04.025>.
- Shi, Yujiang, Fei Lan, Caitlin Matson, Peter Mulligan, Johnathan R. Whetstine, Philip A. Cole, Robert A. Casero, et Yang Shi. 2004. « Histone Demethylation Mediated by the Nuclear Amine Oxidase Homolog LSD1 ». *Cell* 119 (7): 941-53. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.12.012>.
- Sirotnak, F. M., et Berend Tolner. 1999. « CARRIER-MEDIATED MEMBRANE TRANSPORT OF FOLATES IN MAMMALIAN CELLS ». *Annual Review of Nutrition* 19 (1): 91-122. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.19.1.91>.

- Sivanand, Sharanya, Isabella Viney, et Kathryn E. Wellen. 2018. « Spatiotemporal Control of Acetyl-CoA Metabolism in Chromatin Regulation ». *Trends in Biochemical Sciences* 43 (1): 61-74. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2017.11.004>.
- Smith, E. Lester. 1948. « Purification of Anti-Pernicious Anæmia Factors from Liver ». *Nature* 161 (4095): 638-39. <https://doi.org/10.1038/161638a0>.
- Spemann, H., et H. Mangold. 2001. « Induction of Embryonic Primordia by Implantation of Organizers from a Different Species. 1923 ». *The International Journal of Developmental Biology* 45 (1): 13-38.
- Srere, Paul A. 1967. « Enzyme Concentrations in Tissues ». *Science* 158 (3803): 936-37. <https://doi.org/10.1126/science.158.3803.936>.
- Stabler, Sally P. 2013. « Clinical Practice. Vitamin B12 Deficiency ». *The New England Journal of Medicine* 368 (2): 149-60. <https://doi.org/10.1056/NEJMcp1113996>.
- Stach, Kamilla, Wojciech Stach, et Katarzyna Augoff. 2021. « Vitamin B6 in Health and Disease ». *Nutrients* 13 (9): 3229. <https://doi.org/10.3390/nu13093229>.
- Steinberg, S. E. 1984. « Mechanisms of Folate Homeostasis ». *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 246 (4): G319-24. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1984.246.4.G319>.
- Stillman, Bruce. 2018. « Histone Modifications: Insights into Their Influence on Gene Expression ». *Cell* 175 (1): 6-9. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.08.032>.
- Stover, Patrick J., et Martha S. Field. 2011. « Trafficking of Intracellular Folates ». *Advances in Nutrition* 2 (4): 325-31. <https://doi.org/10.3945/an.111.000596>.
- Sun, Yudong, et Jason W. Locasale. 2022. « Rethinking the Bioavailability and Cellular Transport Properties of S-Adenosylmethionine ». *Cell Stress* 6 (1): 1-5. <https://doi.org/10.15698/cst2022.01.261>.
- Sundler, R., et B. Akesson. 1975. « Regulation of Phospholipid Biosynthesis in Isolated Rat Hepatocytes. Effect of Different Substrates ». *The Journal of Biological Chemistry* 250 (9): 3359-67.
- Suormala, Terttu, Matthias R. Baumgartner, David Coelho, Petra Zavadakova, Viktor Kozich, Hans Georg Koch, Martin Berghäuser, et al. 2004. « The cblD Defect Causes Either Isolated or Combined Deficiency of Methylcobalamin and Adenosylcobalamin Synthesis ». *The Journal of Biological Chemistry* 279 (41): 42742-49. <https://doi.org/10.1074/jbc.M407733200>.
- Takemori, Nobuaki, Naoka Komori, James N. Thompson, Masa-Toshi Yamamoto, et Hiroyuki Matsumoto. 2007. « Novel Eye-Specific Calmodulin Methylation Characterized by Protein Mapping in *Drosophila Melanogaster* ». *Proteomics* 7 (15): 2651-58. <https://doi.org/10.1002/pmic.200700343>.
- Tanner, Stephan M., Zhongyuan Li, James D. Perko, Cihan Oner, Mualla Cetin, Cigdem Altay, Zekiye Yurtsever, et al. 2005. « Hereditary Juvenile Cobalamin Deficiency Caused by Mutations in the Intrinsic Factor Gene ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (11): 4130-33. <https://doi.org/10.1073/pnas.0500517102>.
- Tanno, Masaya, Jun Sakamoto, Tetsuji Miura, Kazuaki Shimamoto, et Yoshiyuki Horio. 2007. « Nucleocytoplasmic Shuttling of the NAD⁺-Dependent Histone Deacetylase SIRT1 ». *The Journal of Biological Chemistry* 282 (9): 6823-32. <https://doi.org/10.1074/jbc.M609554200>.

- Tibbetts, Anne S., et Dean R. Appling. 2010. « Compartmentalization of Mammalian Folate-Mediated One-Carbon Metabolism ». *Annual Review of Nutrition* 30 (août):57-81. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.012809.104810>.
- Tomasi, Maria Lauda, Minjung Ryoo, Komal Ramani, Ivan Tomasi, Pasquale Giordano, José M. Mato, et Shelly C. Lu. 2015. « Methionine Adenosyltransferase A2 Sumoylation Positively Regulate Bcl-2 Expression in Human Colon and Liver Cancer Cells ». *Oncotarget* 6 (35): 37706-23. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5342>.
- Tompkins, Joshua D. 2022. « Discovering DNA Methylation, the History and Future of the Writing on DNA ». *Journal of the History of Biology* 55 (4): 865-87. <https://doi.org/10.1007/s10739-022-09691-8>.
- Trakadis, Y. J., A. Alfares, O. A. Bodamer, M. Buyukavci, J. Christodoulou, P. Connor, E. Glamuzina, et al. 2014. « Update on Transcobalamin Deficiency: Clinical Presentation, Treatment and Outcome ». *Journal of Inherited Metabolic Disease* 37 (3): 461-73. <https://doi.org/10.1007/s10545-013-9664-5>.
- Tu, Benjamin P., Andrzej Kudlicki, Maga Rowicka, et Steven L. McKnight. 2005. « Logic of the Yeast Metabolic Cycle: Temporal Compartmentalization of Cellular Processes ». *Science* 310 (5751): 1152-58. <https://doi.org/10.1126/science.1120499>.
- Ueland, Per Magne. 2011. « Choline and Betaine in Health and Disease ». *Journal of Inherited Metabolic Disease* 34 (1): 3-15. <https://doi.org/10.1007/s10545-010-9088-4>.
- Valdar, W. S., et J. M. Thornton. 2001. « Protein-Protein Interfaces: Analysis of Amino Acid Conservation in Homodimers ». *Proteins* 42 (1): 108-24.
- Vázquez-Chantada, Mercedes, David Fernández-Ramos, Nieves Embade, Nuria Martínez-Lopez, Marta Varela-Rey, Ashwin Woodhoo, Zigmund Luka, et al. 2010. « HuR/Methyl-HuR and AUF1 Regulate the MAT Expressed during Liver Proliferation, Differentiation, and Carcinogenesis ». *Gastroenterology* 138 (5): 1943-53. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.01.032>.
- Waddington, C. H. 1968. « Towards a Theoretical Biology ». *Nature* 218 (5141): 525-27. <https://doi.org/10.1038/218525a0>.
- Wang, Jian, Zi-Hua Zhu, Hong-Bin Yang, Ye Zhang, Xiang-Ning Zhao, Min Zhang, Ying-Bin Liu, Ying-Ying Xu, et Qun-Ying Lei. 2016. « Cullin 3 Targets Methionine Adenosyltransferase II α for Ubiquitylation-Mediated Degradation and Regulates Colorectal Cancer Cell Proliferation ». *The FEBS Journal* 283 (13): 2390-2402. <https://doi.org/10.1111/febs.13759>.
- Wang, Kuifeng, Shanhua Fang, Qian Liu, Jing Gao, Xiaoning Wang, Hongwen Zhu, Zhenyun Zhu, et al. 2019. « TGF-B1/P65/MAT2A Pathway Regulates Liver Fibrogenesis via Intracellular SAM ». *EBioMedicine* 42 (avril):458-69. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.03.058>.
- Wang, Yi-Cheng, Wei-Li Lin, Yan-Jun Lin, Feng-Yao Tang, Yi-Ming Chen, et En-Pei Isabel Chiang. 2014. « A Novel Role of the Tumor Suppressor GNMT in Cellular Defense against DNA Damage ». *International Journal of Cancer* 134 (4): 799-810. <https://doi.org/10.1002/ijc.28420>.
- Watkins, D., et D. S. Rosenblatt. 1986. « Failure of Lysosomal Release of Vitamin B12: A New Complementation Group Causing Methylmalonic Aciduria (cblF) ». *American Journal of Human Genetics* 39 (3): 404-8.
- Watkins, David, et David S. Rosenblatt. 2011. « Inborn Errors of Cobalamin Absorption and Metabolism ». *American Journal of Medical Genetics. Part C, Seminars in Medical Genetics* 157C (1): 33-44. <https://doi.org/10.1002/ajmg.c.30288>.

- . 2016. « Lessons in Biology from Patients with Inherited Disorders of Vitamin B12 and Folate Metabolism ». *Biochimie* 126 (juillet):3-5. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2016.05.001>.
- Watson, J. D., et F. H. Crick. 1953. « Molecular Structure of Nucleic Acids; a Structure for Deoxyribose Nucleic Acid ». *Nature* 171 (4356): 737-38. <https://doi.org/10.1038/171737a0>.
- Wellen, Kathryn E., Georgia Hatzivassiliou, Uma M. Sachdeva, Thi V. Bui, Justin R. Cross, et Craig B. Thompson. 2009. « ATP-Citrate Lyase Links Cellular Metabolism to Histone Acetylation ». *Science* 324 (5930): 1076-80. <https://doi.org/10.1126/science.1164097>.
- Wellen, Kathryn E., et Nathaniel W. Snyder. 2019. « Should We Consider Subcellular Compartmentalization of Metabolites, and If so, How Do We Measure Them? » *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care* 22 (5): 347-54. <https://doi.org/10.1097/MCO.0000000000000580>.
- Werge, Mikkel Parsberg, Adrian McCann, Elisabeth Douglas Galsgaard, Dorte Holst, Anne Bugge, Nicolai J. Wewer Albrechtsen, et Lise Lotte Gluud. 2021. « The Role of the Transsulfuration Pathway in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease ». *Journal of Clinical Medicine* 10 (5): 1081. <https://doi.org/10.3390/jcm10051081>.
- Wiedemann, Arnaud, Abderrahim Oussalah, Rosa-Maria Guéant Rodriguez, Elise Jeannesson, Marc Mertens, Irina Rotaru, Jean-Marc Alberto, et al. 2024. « Multiomic Analysis in Fibroblasts of Patients with Inborn Errors of Cobalamin Metabolism Reveals Concordance with Clinical and Metabolic Variability ». *EBioMedicine* 99 (janvier):104911. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2023.104911>.
- Wills, L. 1931. « TREATMENT OF “PERNICIOUS ANAEMIA OF PREGNANCY” AND “TROPICAL ANAEMIA” ». *BMJ* 1 (3676): 1059-64. <https://doi.org/10.1136/bmj.1.3676.1059>.
- Wolthers, Kirsten R., Xiaodong Lou, Helen S. Toogood, David Leys, et Nigel S. Scrutton. 2007. « Mechanism of Coenzyme Binding to Human Methionine Synthase Reductase Revealed through the Crystal Structure of the FNR-like Module and Isothermal Titration Calorimetry ». *Biochemistry* 46 (42): 11833-44. <https://doi.org/10.1021/bi701209p>.
- Wolthers, Kirsten R., et Nigel S. Scrutton. 2007. « Protein Interactions in the Human Methionine Synthase-Methionine Synthase Reductase Complex and Implications for the Mechanism of Enzyme Reactivation ». *Biochemistry* 46 (23): 6696-6709. <https://doi.org/10.1021/bi700339v>.
- Woodward, R. B. 1973. « The Total Synthesis of Vitamin B 12 ». *Pure and Applied Chemistry. Chimie Pure Et Appliquee* 33 (1): 145-77. <https://doi.org/10.1351/pac197333010145>.
- Wright, Anthony J. A., Jack R. Dainty, et Paul M. Finglas. 2007. « Folic Acid Metabolism in Human Subjects Revisited: Potential Implications for Proposed Mandatory Folic Acid Fortification in the UK ». *British Journal of Nutrition* 98 (04). <https://doi.org/10.1017/S0007114507777140>.
- Wu, S. E., W. P. Huskey, R. T. Borchardt, et R. L. Schowen. 1983. « Chiral Instability at Sulfur of S-Adenosylmethionine ». *Biochemistry* 22 (12): 2828-32. <https://doi.org/10.1021/bi00281a009>.
- Xia, Meng, Yongheng Chen, Ling-Chi Wang, Ebrahim Zandi, Heping Yang, Sean Bermanian, M. Luz Martínez-Chantar, José M. Mato, et Shelly C. Lu. 2010. « Novel Function and Intracellular Localization of Methionine Adenosyltransferase 2beta Splicing Variants ». *The Journal of Biological Chemistry* 285 (26): 20015-21. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.094821>.

- Xie, Chong, Rossana Coda, Bhawani Chamlagain, Pekka Varmanen, Vieno Piironen, et Kati Katina. 2019. « Co-Fermentation of Propionibacterium Freudenreichii and Lactobacillus Brevis in Wheat Bran for in Situ Production of Vitamin B12 ». *Frontiers in Microbiology* 10:1541. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01541>.
- Yamada, Kazuhiro, Roy A. Gravel, Tetsuo Toraya, et Rowena G. Matthews. 2006. « Human Methionine Synthase Reductase Is a Molecular Chaperone for Human Methionine Synthase ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (25): 9476-81. <https://doi.org/10.1073/pnas.0603694103>.
- Yang, Heping, Ainhoa Iglesias Ara, Nathaniel Magilnick, Meng Xia, Komal Ramani, Hui Chen, Taunia D. Lee, José M. Mato, et Shelly C. Lu. 2008. « Expression Pattern, Regulation, and Functions of Methionine Adenosyltransferase 2beta Splicing Variants in Hepatoma Cells ». *Gastroenterology* 134 (1): 281-91. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.10.027>.
- Yang, Heping, Ting Liu, Jiaohong Wang, Tony W. H. Li, Wei Fan, Hui Peng, Anuradha Krishnan, Gregory J. Gores, Jose M. Mato, et Shelly C. Lu. 2016. « Deregulated Methionine Adenosyltransferase A1, c-Myc, and Maf Proteins Together Promote Cholangiocarcinoma Growth in Mice and Humans(†) ». *Hepatology (Baltimore, Md.)* 64 (2): 439-55. <https://doi.org/10.1002/hep.28541>.
- Yang, Heping, Yuhua Zheng, Tony W. H. Li, Hui Peng, David Fernandez-Ramos, María L. Martínez-Chantar, Adriana L. Rojas, José M. Mato, et Shelly C. Lu. 2013a. « Methionine Adenosyltransferase 2B, HuR, and Sirtuin 1 Protein Cross-Talk Impacts on the Effect of Resveratrol on Apoptosis and Growth in Liver Cancer Cells ». *The Journal of Biological Chemistry* 288 (32): 23161-70. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.487157>.
- Yang, Heping, Yuhua Zheng, Tony W.H. Li, Hui Peng, David Fernandez-Ramos, María L. Martínez-Chantar, Adriana L. Rojas, José M. Mato, et Shelly C. Lu. 2013b. « Methionine Adenosyltransferase 2B, HuR, and Sirtuin 1 Protein Cross-Talk Impacts on the Effect of Resveratrol on Apoptosis and Growth in Liver Cancer Cells ». *Journal of Biological Chemistry* 288 (32): 23161-70. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.487157>.
- Ye, Cunqi, Benjamin M. Sutter, Yun Wang, Zheng Kuang, et Benjamin P. Tu. 2017. « A Metabolic Function for Phospholipid and Histone Methylation ». *Molecular Cell* 66 (2): 180-193.e8. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.02.026>.
- Ye, Cunqi, et Benjamin P. Tu. 2018. « Sink into the Epigenome: Histones as Repositories That Influence Cellular Metabolism ». *Trends in Endocrinology & Metabolism* 29 (9): 626-37. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2018.06.002>.
- Yoon Soon Shin, Catherine Chan, Amanda J. Vidal, Tom Brody, et E.L.R. Stokstad. 1976. « Subcellular Localization of γ -Glutamyl Carboxypeptidase and of Folates ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 444 (3): 794-801. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(76\)90326-3](https://doi.org/10.1016/0304-4165(76)90326-3).
- Yu, Helen, Nazar Mashtalir, Salima Daou, Ian Hammond-Martel, Julie Ross, Guangchao Sui, Gerald W. Hart, et al. 2010. « The Ubiquitin Carboxyl Hydrolase BAP1 Forms a Ternary Complex with YY1 and HCF-1 and Is a Critical Regulator of Gene Expression ». *Molecular and Cellular Biology* 30 (21): 5071-85. <https://doi.org/10.1128/MCB.00396-10>.
- Yu, Hung-Chun, Jennifer L. Sloan, Gunter Scharer, Alison Brebner, Anita M. Quintana, Nathan P. Achilly, Irini Manoli, et al. 2013. « An X-Linked Cobalamin Disorder Caused by Mutations in Transcriptional Coregulator HCFC1 ». *American Journal of Human Genetics* 93 (3): 506-14. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2013.07.022>.

- Zakrzewski, S. F. 1966. « Evidence for the Chemical Interaction between 2-Mercaptoethanol and Tetrahydrofolate ». *The Journal of Biological Chemistry* 241 (12): 2957-61.
- Zavadáková, Petra, Brian Fowler, Terttu Suormala, Zorka Novotna, Peter Mueller, Julia B. Hennermann, Jirí Zeman, et al. 2005. « cblE Type of Homocystinuria Due to Methionine Synthase Reductase Deficiency: Functional Correction by Minigene Expression ». *Human Mutation* 25 (3): 239-47. <https://doi.org/10.1002/humu.20131>.
- Zecchin, Annalisa, Peter C Stapor, Jermaine Goveia, et Peter Carmeliet. 2015. « Metabolic Pathway Compartmentalization: An Underappreciated Opportunity? » *Current Opinion in Biotechnology* 34 (août):73-81. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2014.11.022>.
- Zeisel, Steven H. 2013. « Metabolic Crosstalk between Choline/1-Carbon Metabolism and Energy Homeostasis ». *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 51 (3): 467-75. <https://doi.org/10.1515/cclm-2012-0518>.
- Zhang, Jun, Gui-Cen Liu, Xiao-Lu Dai, Juan Wang, Mu-Hua Jin, Nan-Nan Mi, et Shu-Qin Wang. 2020. « The N-Terminus of MTRR Plays a Role in MTR Reactivation Cycle beyond Electron Transfer ». *Bioorganic Chemistry* 100 (juillet):103836. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.103836>.
- Zhang, Tong, Jhoanna G. Berrocal, Kristine M. Frizzell, Matthew J. Gamble, Michelle E. DuMond, Raga Krishnakumar, Tianle Yang, Anthony A. Sauve, et W. Lee Kraus. 2009. « Enzymes in the NAD⁺ Salvage Pathway Regulate SIRT1 Activity at Target Gene Promoters ». *The Journal of Biological Chemistry* 284 (30): 20408-17. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.016469>.
- Zhao, Cunzhen, Haigang Wu, Naren Qimuge, Weijun Pang, Xiao Li, Guiyan Chu, et Gongshe Yang. 2018. « MAT2A Promotes Porcine Adipogenesis by Mediating H3K27me3 at Wnt10b Locus and Repressing Wnt/ β -Catenin Signaling ». *Biochimica Et Biophysica Acta. Molecular and Cell Biology of Lipids* 1863 (2): 132-42. <https://doi.org/10.1016/j.bbailip.2017.11.001>.
- Zhao, Lin-Yong, Jinghui Song, Yibin Liu, Chun-Xiao Song, et Chengqi Yi. 2020. « Mapping the Epigenetic Modifications of DNA and RNA ». *Protein & Cell* 11 (11): 792-808. <https://doi.org/10.1007/s13238-020-00733-7>.
- Zhao, Rongbao, Larry H. Matherly, et I. David Goldman. 2009. « Membrane Transporters and Folate Homeostasis: Intestinal Absorption and Transport into Systemic Compartments and Tissues ». *Expert Reviews in Molecular Medicine* 11 (janvier):e4. <https://doi.org/10.1017/S1462399409000969>.
- Zhao, Shuai, C. David Allis, et Gang Greg Wang. 2021. « The Language of Chromatin Modification in Human Cancers ». *Nature Reviews Cancer* 21 (7): 413-30. <https://doi.org/10.1038/s41568-021-00357-x>.
- Zhao, Zhiqiang, Li Wang, et Lijun Di. 2016. « Compartmentation of Metabolites in Regulating Epigenome of Cancer ». *Molecular Medicine (Cambridge, Mass.)* 22 (septembre):349-60. <https://doi.org/10.2119/molmed.2016.00051>.
- Zheng, Yuxiang, et Lewis C. Cantley. 2019. « Toward a Better Understanding of Folate Metabolism in Health and Disease ». *Journal of Experimental Medicine* 216 (2): 253-66. <https://doi.org/10.1084/jem.20181965>.
- Zuhra, Karim, Fiona Augsburg, Tomas Majtan, et Csaba Szabo. 2020. « Cystathionine- β -Synthase: Molecular Regulation and Pharmacological Inhibition ». *Biomolecules* 10 (5): 697. <https://doi.org/10.3390/biom10050697>.

Résumé

La régulation de l'expression des gènes dépend de modifications épigénétiques affectant les acides nucléiques et les histones. La modification la plus étudiée est la méthylation qui requiert la S-adenosyl-méthionine (SAM) comme donneur de groupement méthyle. Ce métabolite crucial est produit durant le métabolisme des monocarbone où la méthionine synthase (MS) joue un rôle central à l'interface entre le cycle des folates et le cycle de la méthionine. En effet, la MS, une enzyme strictement cytosolique, catalyse la reméthylation de l'homocystéine pour former la méthionine, le précurseur de la SAM, en utilisant le 5-méthyltétrahydrofolate (5meTHF) et la vitamine B12 comme cofacteur. Des erreurs acquises ou innées du métabolisme des monocarbone associées à des dysfonctionnements de l'activité de la MS induisent une diminution de la synthèse de méthionine et de SAM ayant pour conséquence des altérations épigénétiques malgré la présence de méthionine exogène. Ceci suggère une utilisation préférentielle de la méthionine produite *de novo* pour la synthèse de SAM ainsi qu'une production locale de métabolites, une localisation nucléaire de la MS et de nouvelles interactions protéine-protéine impliquant les méthionine adénosyl transférases (MAT) responsables de la synthèse de SAM. Nous avons émis l'hypothèse que le cycle de la méthionine pourrait aussi être présent dans le noyau pour permettre une synthèse *in situ* de méthionine et de SAM directement où la méthylation est nécessaire. Nous avons étudié la localisation, l'activité enzymatique et les potentielles interactions protéine-protéine impliquant la MS dans le cytoplasme et dans le noyau des cellules HepG2, ainsi que sur des fibroblastes contrôles et de patients présentant des mutations génétiques affectant l'activité de la MS. Nos résultats montrent que la MS, habituellement décrite dans le cytoplasme est aussi localisée dans le noyau où elle interagit avec la sous-unité catalytique MAT α 2 et l'ADN méthyltransférase DNMT3b. La preuve expérimentale de l'activité de la MS dans le compartiment nucléaire, ces nouvelles interactions protéine-protéine entre la MS, une enzyme productrice de SAM et une autre utilisant la SAM pour la méthylation de l'ADN supportent l'idée d'une compartimentation spatiale des voies métaboliques pouvant jouer un rôle dans la régulation dynamique de l'épigénome. Notre étude ouvre donc de nouvelles perspectives dans la compréhension des modifications épigénomiques impliquées dans la régulation de l'expression des gènes.

Mots clés : méthionine synthase, méthionine adénosyl-transférase, ADN méthyltransférase, compartimentation, métabolisme des monocarbone, déficience en cobalamine.

Abstract

The regulation of gene expression depends on epigenetic modifications of nucleic acids and histones. The most studied modification is the methylation that requires S-adenosyl-methionine (SAM) as methyl donor. This crucial metabolite is a product of the one-carbon metabolism, where methionine synthase (MS) plays a central role at the crossroad of folate and methionine cycles. MS, a strictly cytosolic enzyme, catalyzes the remethylation of homocysteine to produce methionine, the precursor of SAM, using 5-methyltetrahydrofolate (5meTHF) and vitamin B12 as a cofactor. Acquired or inherited disorders of one-carbon metabolism associated with impaired methionine synthase activity, lead to decreased synthesis of both methionine and SAM, with subsequent epigenetic alterations, despite the presence of exogenous methionine. This suggests a preferential use of *de novo* produced methionine for SAM synthesis as well as local production of metabolites, nuclear localisation of MS and novel protein-protein interactions involving the methionine adenosyl transferases (MATs) responsible for SAM synthesis. We hypothesised that the methionine cycle could also be present in the nucleus to allow *in situ* synthesis of methionine and SAM directly where methylation is required. We studied the localisation, enzymatic activity and potential protein-protein interactions involving MS in the cytoplasm and nucleus of HepG2 cells, as well as in control fibroblasts and fibroblasts from patients with genetic mutations affecting MS activity. Our results show that MS, usually described exclusively in the cytoplasm, is also located in the nucleus where it interacts with the catalytic subunit MAT α 2 and the DNA methyltransferase DNMT3b. The experimental evidence of MS activity in the nuclear compartment, these novel protein-protein interactions between MS, a SAM-producing enzyme and a SAM-user enzyme for DNA methylation support the idea of spatial compartmentalisation of metabolic pathways may play a role in the dynamic regulation of the epigenome. Our study therefore opens up new perspectives in the understanding of the epigenomic modifications involved in regulating gene expression.

Keywords: methionine synthase, methionine adenosyl-transferase, DNA methyltransferase, compartmentalization, one-carbon metabolism, cobalamin deficiency.