



HAL
open science

L'interactome de la méthionine synthase

Christine Bassila

► **To cite this version:**

Christine Bassila. L'interactome de la méthionine synthase. Biochimie [q-bio.BM]. Université de Lorraine, 2016. Français. NNT : 2016LORR0267 . tel-01535960

HAL Id: tel-01535960

<https://theses.hal.science/tel-01535960>

Submitted on 9 Jun 2017

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

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



AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

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

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

Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LORRAINE

Mention : "Sciences de la Vie et de la Santé"

Par **Christine BASSILA**

L'interactome de la méthionine synthase

Membres du Jury

Rapporteurs :

M. Emmanuel Andrès PU-PH, Service de Médecine Interne, CHRU de Strasbourg

M. Pascal Reynier PU-PH, Biochimie et Biologie moléculaire, CHU d'Angers

Examineurs :

M. Jean-Louis Guéant PU-PH, UMR Inserm-UL 954, Nancy, Directeur de thèse

M. David Coelho CR1, UMR Inserm-UL 954, Nancy, Co-Directeur de thèse

M. Yuri Motorin PR1, UMR CNRS-UL 7365, Université de Lorraine, Nancy

Mme Marie-Laure Kottler PU-PH, service génétique, CHU de Caen

**UMR Inserm-UL 954, Laboratoire de Nutrition, génétique et exposition aux
risques environnementaux, 9 avenue de la Forêt de Haye,
Faculté de Médecine, 54500 Vandœuvre-lès-Nancy**

Sommaire

LISTE DES PUBLICATIONS ET DES COMMUNICATIONS.....	9
INTRODUCTION	11
PARTIE I : LES DETERMINANTS NUTRITIONNELS DU METABOLISME DES MONOCARBONES	12
A. Cobalamine ou vitamine B12 :.....	12
i. Définition et structure chimique :	12
ii. Histoire :.....	13
iii. Apport nutritionnel :.....	13
iv. Carence en vitamine B12 :.....	14
v. Absorption :.....	14
vi. Transport :.....	16
vii. Métabolisme cellulaire de la cobalamine :.....	17
viii. Stockage et élimination :.....	18
B. Folate (vitamine B9).....	18
i. Définition et structure chimique :	18
ii. Histoire :.....	20
iii. Apport nutritionnel :.....	20
iv. Carence en folates :.....	21
v. Absorption :.....	21
vi. Transport :.....	23
vii. Stockage et élimination :.....	24
viii. Le cycle des folates :.....	24
ix. Rôle des folates :.....	25
PARTIE II : METABOLISME DES MONOCARBONES ET DONNEURS DE METHYLES.....	27
I. Métabolisme des monocarbones :	27
A. Les substrats :.....	27

i.	La méthionine :	27
ii.	La S-adénylméthionine :	27
iii.	La S-adénylhomocystine :	28
iv.	L'homocystéine :	29
B.	Les voies métaboliques de l'homocystéine :	29
i.	La voie de méthylation de l'Hcy en méthionine :	30
ii.	La voie de transulfuration :	31
C.	Les facteurs favorisant une hyper-homocystéinémie :	31
i.	Facteurs environnementaux :	31
ii.	Facteurs génétiques :	32
iii.	Facteurs nutritionnels :	32
iv.	Facteurs pharmacologiques :	33
I.	La méthionine synthase :	34
A.	Les transcrits alternatifs de <i>MTR</i> :	34
i.	Le transcrit MTR-201 :	34
ii.	Le transcrit MTR-002 :	35
iii.	Les transcrits MTR-003 et MTR-004 :	35
B.	La protéine MS :	36
C.	Les modules fonctionnels de la MS :	37
II.	Méthionine synthase réductase :	40
A.	Généralités :	40
B.	La fonction et les propriétés moléculaires de la MSR humaine :	40
C.	Interaction entre MSR et MS chez l'homme :	41
III.	La protéine MMACHC :	43
A.	Complexe entre MMACHC et MS :	43
IV.	La protéine MMADHC :	45
V.	Le complexe MMADHC-MMACHC :	45
PARTIE IV : LES DEFAUTS GENETIQUES DU TRANSPORT, DE L'ABSORPTION ET DU METABOLISME DE LA VITAMINE B12.....		47
I.	Défauts génétiques de l'absorption et du transport de la vitamine B12 :	47

A.	Déficiencia du facteur intrinsèque :	47
B.	Imerslund-Gräsbeck :	48
C.	Déficiencia en transcobalamine :	49
D.	Déficiencia en récepteur de la transcobalamine (CD320) :	50
E.	Déficiencia en haptocorrine :	50
II.	Classification des défauts génétiques affectant le métabolisme intracellulaire de la vitamine B12 par le test de complémentation :	51
II.1	Défauts génétiques affectant sélectivement de la reméthylation de l'homocystéine en méthionine :	54
A.	Les groupes de complémentation cblG et cblE :	54
i.	Etiologie/Pathophysiologie :	54
ii.	Présentation clinique :	54
iii.	Causes génétiques des défauts cblG et de cblE :	55
iv.	Diagnostic :	55
v.	Traitement :	56
B.	Autres causes d'homocystinurie :	56
II.2	Défauts génétiques affectant sélectivement la conversion de l'acide méthylmalonique en succinyl-coenzyme A :	58
A.	Groupes de complémentation cblA, cblB et mut :	58
i.	Etiologie/Pathophysiologie :	58
ii.	Présentation Clinique :	58
iii.	Causes génétiques des défauts cblA, cblB et mut :	59
iv.	Diagnostic :	60
v.	Traitement des patients cblA, cblB et mut :	61
II.3	Défauts génétiques affectant à la fois la synthèse de la méthylcobalamine et de l'adénosycobalamine :	61
A.	Le groupe de complémentation cblF :	61
i.	Etiologie/Pathophysiologie :	61
ii.	Présentation clinique :	62
iii.	Causes génétiques du défaut cblF :	62
iv.	Diagnostic :	62

B.	Le groupe de complémentation cblJ :.....	62
i.	Etiologie/Pathophysiologie :.....	63
ii.	Présentation clinique :.....	63
iii.	Causes génétiques du défaut cblJ :.....	63
iv.	Diagnostic :.....	64
C.	Le groupe de complémentation cblC :.....	64
i.	Etiologie/Pathophysiologie :.....	64
ii.	Présentation clinique :.....	64
iii.	Causes génétiques du défaut cblC :.....	65
iv.	Diagnostic :.....	65
D.	Le groupe de complémentation cblD :.....	66
i.	Etiologie/Pathophysiologie :.....	66
ii.	Présentation clinique :.....	66
iii.	Causes génétiques du défaut CblD :.....	67
iv.	Diagnostic :.....	67
E.	Le traitement des défauts cblC, cblF, cblD, et cblJ :.....	68
F.	Le groupe de complémentation cblX :.....	69
II.4	Un nouveau groupe de complémentation ?.....	70
	OBJECTIFS.....	71
	APPROCHE EXPERIMENTALE &.....	73
	METHODOLOGIE.....	73
I.	Modèle cellulaire :.....	74
A.	Matériels :.....	74
i.	Lignées cellulaires :.....	74
ii.	Culture en monocouche :.....	75
iii.	Transfection des cellules HepG2 par des siARN :.....	75
iv.	Congélation des cellules :.....	76
v.	Extraction des protéines pour l'étude par Western Blot :.....	77

vi. Dosage des protéines par la méthode de l'acide bicinchoninique (BCA) :	77
vii. Western Blot : immunodétection sur membrane.....	78
1. Préparation des gels :	78
2. Préparation des échantillons :	80
3. Électrophorèse :	80
4. Transfert des protéines sur membrane de PVDF :	80
5. Immunoblot:	81
viii. Immunofluorescence :	82
ix. Duolink :	83
1. Protocole d'analyse :	83
2. Sondes PLA :	84
3. Protocole de détection :	84
x. Immunoprécipitation (IP) :	84
1. Extraction des protéines :	84
2. Immunoprécipitation de la protéine cible :	85
xi. Fractionnement cytoplasmique et nucléaire :	85
RESULTATS.....	87
A. Expression de MS, MSR, MMACHC et MMADHC :	88
B. Identification de nouvelles interactions : MS/MMADHC, MSR/MMADHC et MSR/MMACHC	91
i. Résultats obtenus par co- immunoprécipitation :	91
ii. Résultats obtenus par la technique de Duolink® in situ proximity ligation assay :	92
C. Confirmation des interactions dans les fibroblastes des patients :	96
i. Résultats obtenus par co-immunoprécipitation :	96
ii. Résultats obtenus par la technique de Duolink® in situ proximity ligation assay dans les fibroblastes des patients cblC, cblG-variant, cblE, cblD et du contrôle (WT) :	97
D. Localisation intracellulaire des protéines MS, MSR, MMACHC, MMADHC, MAT1A, MAT2A, MAT2B dans les cellules HepG2 :	102

i.	Résultats obtenus par immunofluorescence :	102
ii.	Résultats obtenus par fractionnement cellulaire :	102
E.	Identification de l'interaction potentielle entre la protéine MS et les trois isoformes de MAT :	104
F.	Localisation intracellulaire des interactions entre MS/MSR, MS/MMACHC, MS/MAT1A, MS/MAT2A et MS/MAT2B après knockdown de MAT1A :	107
G.	Localisation intracellulaire de MS, MSR, MMACHC, MMADHC, MAT2A et MAT2B après knockdown de MAT1A :	107
	DISCUSSION	110
	RÉFÉRENCES	124

LISTE DES PUBLICATIONS ET DES COMMUNICATIONS

Article accepté “BBA Molecular Basis of disease”

C Bassila, R Ghemrawi, J Flayac, DS Froese, MR Baumgartner, JL Guéant et D Coelho. Methionine synthase and methionine synthase reductase interact with MMACHC and with MMADHC.

Manuscript en preparation “Human Genetics”

D Coelho, C Chéry, A Wiedemann, C Bassila, M Cochez, K Albrecht, F Feillet, JL Guéant. Analysis of 14 patients with inherited cobalamin malabsorption revealed novel mutations in CUBN and GIF genes.

Communications par affiche en lien avec mon sujet :

- C Bassila, R Ghemrawi, J Flayac, JL Guéant, D Coelho. Identification of new protein members of the methionine synthase interactome. Annual Symposium of the Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism (SSIEM), Lyon, France, 2015.

- C Bassila, R Ghemrawi, J Flayac, J-L Guéant, D Coelho. Characterization of the methionine synthase interactome. 10th International conference One Carbon Metabolism and Homocysteine, Nancy, France, 2015.

Communications orales et par affiche en collaboration :

- A Wiedemann, J Flayac, R Ghemrawi, C Bassila, D Coelho, JL Guéant. CblC and CblG defects of vitamin B12 metabolism lead to endoplasmic reticulum stress and apoptosis that could be rescued by pharmacological activation of SIRT1 by SRT1720 treatment. Annual Symposium of the Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism (SSIEM), Lyon, France, 2015.

- A Wiedemann, J Flayac, R Ghemrawi, C Bassila, D Coelho, JL Guéant. Pharmacological activation of SIRT1 by SRT1720 treatment rescues the endoplasmic reticulum stress associated with CblC and CblG defects. 10th International conference One Carbon Metabolism and Homocysteine, Nancy, France, 2015

INTRODUCTION

PARTIE I : LES DETERMINANTS NUTRITIONNELS DU METABOLISME DES MONOCARBONES

A. Cobalamine ou vitamine B12 :

i. Définition et structure chimique :

La vitamine B12, également appelée cobalamine, est une vitamine hydrosoluble essentielle au fonctionnement normal du cerveau, du système nerveux, et tout particulièrement de la gaine de myéline, et à la synthèse des globules rouges. Les cobalamines ont une structure chimique proche de l'hème mais l'atome central de fer y est remplacé par un atome de cobalt, d'où leur nom. La cobalamine est une macromolécule organométallique et volumineuse qui possède un noyau corrinnoïde presque plan, formé de quatre molécules de pyrrole, au centre duquel se trouve un atome de cobalt, et d'une structure benzimidazole-ribose-acide phosphorique liée à ce noyau (Figure 1). Le groupement variable R se trouve en position axiale supérieure par rapport au premier plan formé par le noyau corrine, et il est lié à l'atome de cobalt de manière covalente. Ce groupement détermine le nom du composé vitaminiqque suivant les substituants fixes : CN pour cyanocobalamine (forme circulante), OH pour hydroxocobalamine (forme circulante), CH₃ pour méthylcobalamine (cofacteur de réactions de reméthylation en particulier dans la formation de la méthionine à partir de l'homocystéine) et adénosyl pour 5'- désoxyadénosylcobalamine (cofacteur de la méthylmalonyl-CoA-mutase). Le cobalt présent au centre du noyau tétrapyrrolique peut se trouver sous différents degrés d'oxydoréduction, trivalente, divalente ou monovalente.

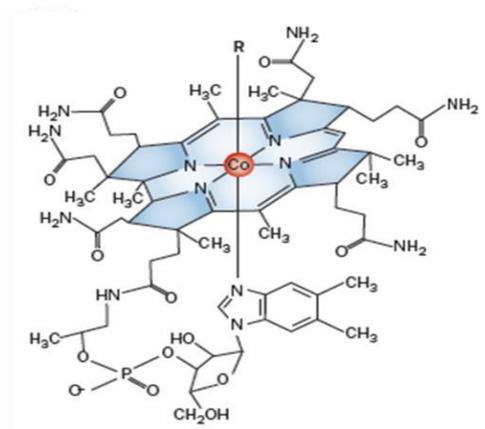


Figure 1 : Structure chimique de la vitamine B12

ii. Histoire :

En 1920, George Whipple, George Minot et William Murphy démontrèrent que des extraits de foie étaient capables d'interrompre l'évolution progressive de l'anémie pernicieuse. Grâce aux travaux de Mary Shorb, la vitamine B12 a été isolée en 1948 à partir du foie par l'équipe de Karl Folker du laboratoire Merck, puis par Lester Smith du laboratoire Glaxo la même année (Rickes et al, 1948 ; Smith, 1948). Vers 1956, la configuration tridimensionnelle fut identifiée par Dorothy Hodgkin qui eu le prix Nobel de chimie en 1964 (Hodgkin et al, 1956). Ensuite, le facteur intrinsèque (FI), transporteur indispensable à l'absorption de la cobalamine, a été décrit par Castle et purifié par R. Gräsbeck en 1965 (Gräsbeck et al, 1965).

iii. Apport nutritionnel :

L'apport en vitamine B12 est exclusivement d'origine alimentaire. La cobalamine est présente dans tous les aliments d'origine animale, en particulier les viandes rouges, les abats, les œufs, les poissons et les crustacés. Les apports nutritionnels conseillés (ANC) de l'adulte sont très faibles, de l'ordre de 2,4 µg/kg/jour, avec une augmentation des apports de 1,5 µg/jour en cas de dépenses énergétiques élevées chez le sportif (>1800 Kcal/jour chez la femme et > 2200 Kcal/jour chez l'homme) (Tableau 1).

Catégorie	ANC 2001 (µg/jour)
Nourrissons	0.5
Enfant de 1-3 ans	0.8
Enfant de 4-6 ans	1.1
Enfant de 7-9 ans	1.4
Enfant de 10-12 ans	1.9
Adolescents de 13-19 ans	2.3-2.4
Hommes adultes	2.4
Femmes adultes	2.4
Personnes âgées de plus de 75 ans	3
Femmes enceintes	2.6
Femmes allaitantes	2.8

Tableau 1. Apports nutritionnels conseillés (ANC) en vitamine B12 pour la population française. Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, 3ème édition, Ed. Tec & Doc.

iv. Carence en vitamine B12 :

La carence en vitamine B12 est considérée comme un problème majeur de santé publique par l'OMS. Chez les populations âgées, elle est de 10 à 30% (Andrès et al, 2004 ; Herrmann et Obeid, 2008), dans les pays latino-américains et les Caraïbes, elle est entre 3 et 30% (Brito et al, 2015), et dans les pays en voie de développement elle est de 50% (Masalha et al, 2002). Ces valeurs sont cependant discutées par différents auteurs car les critères utilisés ne sont pas toujours les mêmes. Les carences d'apport sont plutôt rares chez l'adulte en bonne santé dans les pays industrialisés mais plus fréquentes chez les sujets végétaliens. Les maladies digestives et la malabsorption peuvent être à l'origine d'une carence en vitamine B12. Les gastrectomies totales ou partielles, la bothriocéphalose provoquée par des parasites intestinaux, la pancréatite chronique, la maladie de Crohn, les lymphomes, la tuberculose intestinale et l'anémie de Biermer en sont des exemples (Guéant et Namour, 2004). Des études récentes ont montré qu'une déficience en cobalamine durant le premier trimestre de la grossesse conduit à une augmentation du risque de petit poids à la naissance et à la survenue du syndrome métabolique et de l'insulino-résistance chez les adolescents (Molina et al, 2008 ; Guéant et al, 2013). L'anémie de Biermer est une maladie auto-immune caractérisée par la destruction de la muqueuse gastrique par des auto-anticorps anti-cellules pariétales gastriques (62% des patients) et auto-anticorps anti-facteur intrinsèque (FI) (87,5% des patients) empêchant la liaison de la vitamine B12 au FI. Au moins un des deux types d'anticorps sont présents chez 96% des patients.

v. Absorption :

L'absorption de la cobalamine par notre organisme est un processus très complexe et délicat car il nécessite l'intervention d'un grand nombre de molécules capables de se lier à la vitamine B12 (Figure 2).

Dans le milieu acide de l'estomac, les sécrétions chlorohydropeptiques libèrent la cobalamine des protéines alimentaires. La cobalamine se lie ensuite à un ligand protéique, l'haptocorrine qui est d'origine salivaire et gastrique jusqu'à ce que les

protéases pancréatiques la détruisent au niveau duodénal (Russell-Jones et Alpers, 1999). De nouveau libre dans un environnement plus alcalin, la vitamine B12 va être transférée sur le facteur intrinsèque secrété par les cellules pariétales de l'estomac (Nicolas et Guéant, 1994). Ceci va permettre à la cobalamine de franchir la partie distal de l'iléon (Ganesan et al, 2002) où elle va se fixer sur un récepteur spécifique de la bordure en brosse des cellules épithéliales de l'iléon : le complexe Cubam, formé la cubiline (codée par le gène *CUBN*) et de la protéine l'amnioless (codée par le gène *AMN*) (Kozyraki et Gofflot, 2007 ; Guéant et al, 2001). L'internalisation du complexe Cbl-FI se fait au niveau de l'iléon distal par endocytose du récepteur, permettant ainsi le passage de la cobalamine dans la circulation. Les mutations des gènes *CUBN* et *AMN* sont à la base de la maladie d'Imerslund-Gräsbeck (Gräsbeck et al, 1960 ; Pedersen et al, 2010 ; Fyfe et al, 2013). La cubuline, qui est une grande protéine périphérique de 480 kDa, est formée d'une séquence amino-terminale de 110 acides aminés, et d'un assemblage de 35 modules extracellulaires comportant 8 motifs EGF (epidermal growth factor) de type B et 27 domaines CUB (complément C1r/C1s, Uegf [epidermal growth factor sea urchin related protein] et bone morphogenic protein-1) (Andersen et al, 2010 ; Nielsen et al, 2012). La structure de l'amnioless (48 kDa) montre un domaine transmembranaire qui fixe la cubiline dans la membrane de l'entérocyte (Pederson et al, 2010). De plus, elle est indispensable à l'expression de la cubiline au niveau des cellules épithéliales rénales et intestinales (Namour et al, 2011). Une fois fixée au récepteur, le complexe est rapidement internalisé (endocytose) et la vitamine B12 est absorbée selon un mécanisme actif et va se lier à la transcobalamine II dans le sang pour être ensuite libérée dans la partie basolatérale (Pons et al, 2000).

Vu la complexité des mécanismes d'absorption, l'absorption de la vitamine B12 est lente et limitée (l'absorption est saturée au-delà de 0,7 à 1,1 nmol) (Combs, 1998).

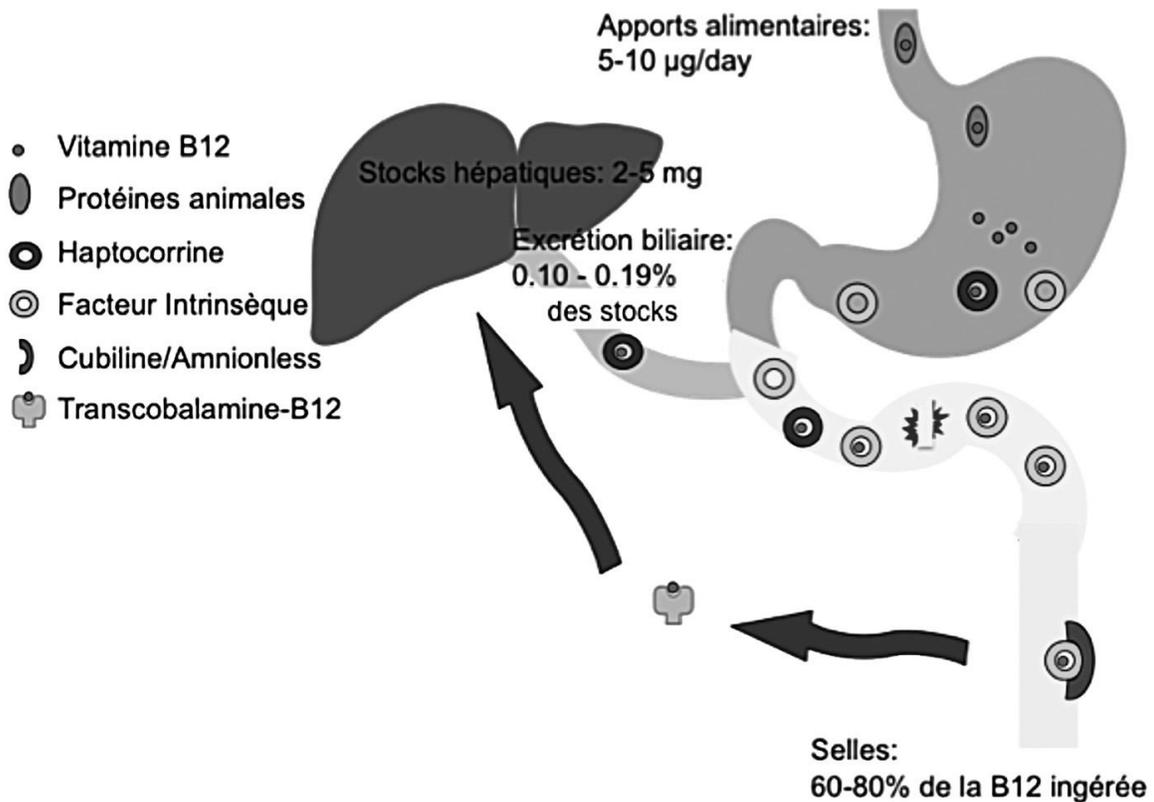


Figure 2 : Vue schématique de l'absorption et du métabolisme digestif de la vitamine B12 (d'après Guéant et al, 2014).

vi. Transport :

Dans le sang, la vitamine B12 est toujours liée à des protéines de transport spécifiques : l'haptocorrine (transcobalamine I ou TCI), le facteur intrinsèque (FI) et la transcobalamine (transcobalamine II ou TCII) (Fedosov, 2012 ; Nielsen et al, 2012). Une partie de la vitamine B12 qui est liée à l'haptocorrine est transportée vers le foie pour être stockée (McDowell, 2000). La cobalamine, liée à la transcobalamine II, se fixe à un récepteur d'endocytose membranaire spécifique aux reins, la mégaline, ou au récepteur CD320 spécifique pour le foie et les autres tissus. Le complexe Cbl/ TCII va être ensuite délivrée aux cellules utilisatrices tels que la moelle osseuse, le foie et les glandes endocrines (Cho et al, 2008 ; Jiang et al, 2013 ; Nielsen et al, 2012 ; Quadros et Sequeira, 2013). Le reste de la cobalamine qui n'est pas stockée ni utilisée comme coenzyme, est libérée dans la circulation sanguine ou dans les fluides extracellulaires via la protéine

MRP1 (multi-drug resistant protein 1) codée par le gène *ABCC1* (Beedholm-Ebsen et al, 2010).

vii. Métabolisme cellulaire de la cobalamine :

Chez l'homme, la cobalamine est utilisée comme cofacteur par deux enzymes : la méthionine synthase (MS) et la L-méthylmalonyl-coenzyme A mutase (MCM).

Suite à sa libération du facteur intrinsèque, la cobalamine est transférée à travers la membrane lysosomale selon un processus impliquant les protéines membranaires LMBD1 et ABCD4, une protéine membranaire lysosomale appartenant à la famille ATP-Binding Cassette (Rutsch et al, 2009 ; Coelho et al, 2012). Le récepteur du facteur intrinsèque est ensuite recyclé et migre vers la membrane cellulaire. Une fois dans le cytoplasme, la cobalamine est prise en charge par la protéine MMACHC. Cette protéine catalyse la réaction de désalkylation des alkylcobalamines, tels que l'adénosylcobalamine (AdoCbl) et la méthylcobalamine (MeCbl), et la réaction de décyanation de la cyanocobalamine (CNCbl) (Kim et al, 2008 ; Hannibal et al, 2009). Par la suite, MMACHC interagit avec la protéine MMADHC, qui va guider la cobalamine vers la voie de synthèse de la MeCbl ou vers la voie de synthèse de l'AdoCbl. Des mutations dans différents domaines de la protéine MMADHC peuvent altérer la synthèse de la MeCbl ou de l'AdoCbl, alors que les mutations qui provoquent une absence totale de cette protéine ont pour conséquence une déficience des deux dérivés enzymatiques de la vitamine B12 (Coelho et al, 2008 ; Stucki et al, 2012).

Dans la mitochondrie, au moins trois protéines sont importantes pour la conversion de l'acide méthylmalonique, dérivé du malonate, en acide succinique. La première protéine est la cobalamine adenosyltransferase qui en interagissant avec une cobalamine réductase non identifiée, réduit la cobalamine en cob(I)lamine, forme nécessaire pour la synthèse d'AdoCbl à partir d'ATP (Padovani et al, 2009). La cobalamine adenosyltransférase en conjonction avec la méthylmalonyl-CoA-mutase transfère le coenzyme AdoCbl à la mutase. Une troisième protéine, MMAA, joue un rôle critique dans la génération et la stabilisation du complexe AdoCbl-mut dans sa forme active. Ceci a été démontré à partir des études sur son orthologue bactérien *meaB* (Banerjee et al, 2009). En se liant à

l'AdoCbl, la mutase catalyse ensuite la migration d'un groupe carbonylCoA entre les carbones adjacents de la MMACoA pour former le succinylCoA (Banerjee 2006).

En cas de carence en vitamine B12, les concentrations sériques et urinaires en acide méthylmalonique sont augmentées entraînant des complications neurologiques.

Dans le cytoplasme, le groupement méthyle de la MeCbl se fixe sur l'homocystéine pour former la méthionine. Lors d'une carence en vitamine B12, le N5-méthylTHF s'accumule et le THF diminue, provoquant une réduction de la synthèse de thymidylate nécessaire à la fabrication de l'ADN.

viii. Stockage et élimination :

Les réserves en vitamine B12 de l'organisme sont importantes. Elles sont estimées à 3-4 mg et sont localisées au niveau hépatique, cardiaque et splénique. Le foie humain comporte approximativement 50% du stock correspondant. Les besoins étant de 2 µg/jour, une carence en B12 ne se manifesterait qu'après plusieurs années. L'élimination quotidienne de la vitamine B12 est de 2 à 5 µg chez l'homme (McDowell, 2000). La voie d'élimination de la cobalamine non utilisée par l'organisme se fait par la bile ou par excrétion urinaire (1.42% +/- 0.92% de la cobalamine totale ingérée) (El kholty et al, 1991). 65 à 75% de la vitamine B12 excrétée par la bile dans l'intestin est réabsorbée au niveau de l'iléon selon le mécanisme d'absorption actif impliquant le facteur intrinsèque (McDowell, 2000).

B. Folate (vitamine B9)

i. Définition et structure chimique :

La vitamine B9, autre nom de l'acide folique (folate), est une vitamine hydrosoluble. Elle joue un rôle de précurseur métabolique d'une coenzyme, la tétrahydrofolate (FH₄ ou THF6), impliquée notamment dans la synthèse des bases nucléiques, purines et pyrimidines, constituant les acides nucléiques (ADN et ARN) du matériel génétique. En raison de sa composition chimique, cette molécule (Figure 3) est également

appelée « acide ptéroylmonoglutamique » et est composée d'un noyau ptérine hétérocyclique lié à un acide p-aminobenzoïque (pABA) sur lequel s'articule une molécule d'acide glutamique (Rebeille et al, 2006). Cette structure de base est partagée par de nombreuses molécules qui se différencient par le niveau d'oxydation du noyau ptérine, par la nature de l'unité monocarbonée, et également par le nombre de résidus constituant la queue polyglutamate. Les formes actives sont les dérivés réduits des polyglutamates (l'acide dihydrofolique (DHF) et l'acide tétrahydrofolique (THF)) et les dérivés du THF : N5-formylTHF, N10-formylTHF, N5-méthylTHF, N5-formiminoTHF, N5, N10-méthylèneTHF et N5, N10-méthénylTHF (Figure 4).

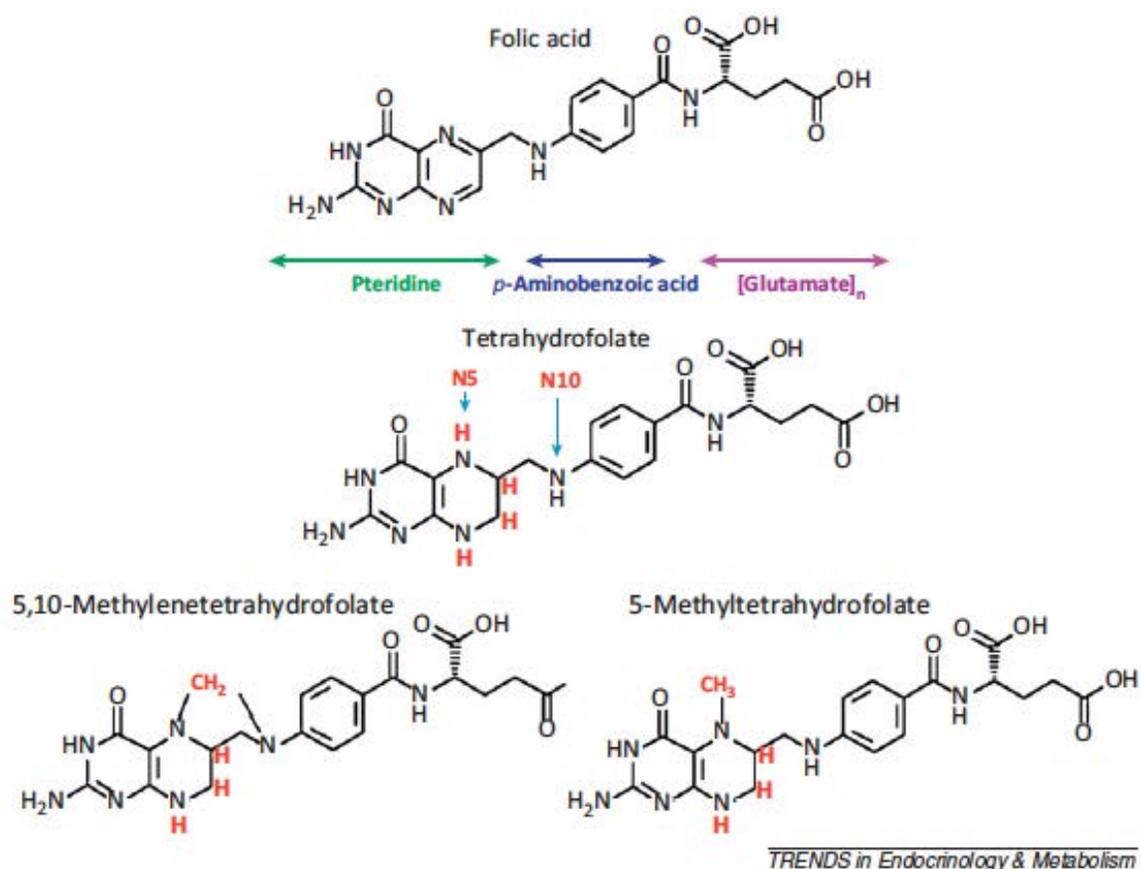


Figure 3 : Structure chimique de l'acide folique et de quelques formes réduites des folates (D'après Guéant et al, 2013).

ii. Histoire :

En 1935, des chercheurs ont identifié le folate comme une substance utilisable dans le traitement de l'anémie chez la femme enceinte et aussi capable de corriger des anomalies sanguines chez les singes (Day, 1935). L'origine du nom « folate » provient du latin folium qui signifie feuille parce que les différents composés ont été isolés à partir de feuilles d'épinard (Mitchell et al, 1988). En 1945, l'acide folique a été synthétisé pour la première fois et a été utilisé pour traiter l'anémie mégaloblastique.

iii. Apport nutritionnel :

L'apport en vitamine B9 est exclusivement alimentaire puisque l'organisme humain est incapable de la synthétiser. La teneur en acide folique est importante dans plusieurs sources alimentaires dont les légumes verts (épinards, concombre, asperges, fenouil, etc.), les organes parenchymateux (foie et reins), les fruits et les graines. Cependant au cours d'une cuisson dépassant la quinzaine de minutes, la vitamine B9 sera dégradée et l'apport diminuera d'une proportion de 95 % (Stea et al, 2007). Les besoins en folates varient en fonction de l'âge, du sexe et de l'état physiologique. Les apports nutritionnels conseillés en acide folique chez l'adulte sont environ de 300 µg/j chez l'adulte et les adolescents, de 150 à 250 µg/j chez les enfants selon la tranche d'âge et de 400 µg/j chez la femme enceinte (Tableau 2).

Catégorie	ANC 2001 (µg/jour)
Nourrissons	70
Enfant de 1-3 ans	100
Enfant de 4-9 ans	150
Enfant de 10-12 ans	250
Adolescents de 13-19 ans	300
Hommes adultes	330
Femmes adultes	300
Personnes âgées de plus de 75 ans	330-400
Femmes enceintes	400
Femmes allaitantes	400

Tableau 2. Apports nutritionnels conseillés (ANC) en folates pour la population française (µg/j). Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, 3ème édition, Ed. Tec & Doc.

iv. Carence en folates :

De nos jours, la déficience en folate est une des carences les plus fréquentes dans le monde et pose un problème de santé publique surtout dans les pays en voie de développement. Les carences en folates causés le plus souvent par un manque d'apport alimentaire, peuvent également avoir pour origine une anomalie génétique dans l'absorption ou bien dans le métabolisme de ce cofacteur. Quelles qu'en soient les causes, les déficiences en folates entraînent de graves maladies comme l'anémie mégalo-blastique, des troubles neurologiques, des maladies cardiovasculaires (Gerhard et Duell, 1999; Refsum et al, 2000) et des malformations congénitales principalement dont les défauts de fermeture du tube neural (NTD) ou spina bifida (Smithells et al, 1976). C'est pour cette raison qu'une supplémentation systématique en folates chez les femmes enceintes a été mise en place (De-Regil et al, 2010) pendant le premier trimestre de la grossesse, réduisant ainsi d'une façon considérable le risque de malformations congénitales (Czeizel and Dudas, 1992; Shaw et al, 1994; Werler et al, 1993).

v. Absorption :

Pour être absorbés par la muqueuse intestinale, les folates polyglutamates doivent subir une déconjugaison en monoglutamates sous l'action de l'enzyme intestinale appelée folylpolyglutamate carboxypeptidase (FGCP) ou γ -glutamyl hydrolase (GH) (McDowell, 2000 ; Smulders et Stehouwer, 2005) (Figure 4). Puis, les monoglutamates sont réduits en THF, et convertis en N5-méthyl-THF qui est la forme unique d'absorption de folates. L'absorption a lieu au niveau du jéjunum proximal de l'intestin grêle (Zhao et al, 2009) et se produit par deux phénomènes distincts : le premier est actif et saturable à un pH optimum acide (Gregory, 2001) et le second s'effectue par diffusion passive lorsque les concentrations en folates sont supérieures à 10 μ M (Blair et al, 1974). Une fois absorbés dans la cellule intestinale et avant d'être libérés dans la veine porte, les monoglutamates sont réduits en THF, puis convertis en N5-méthyl-THF (Smulders et Stehouwer, 2005).

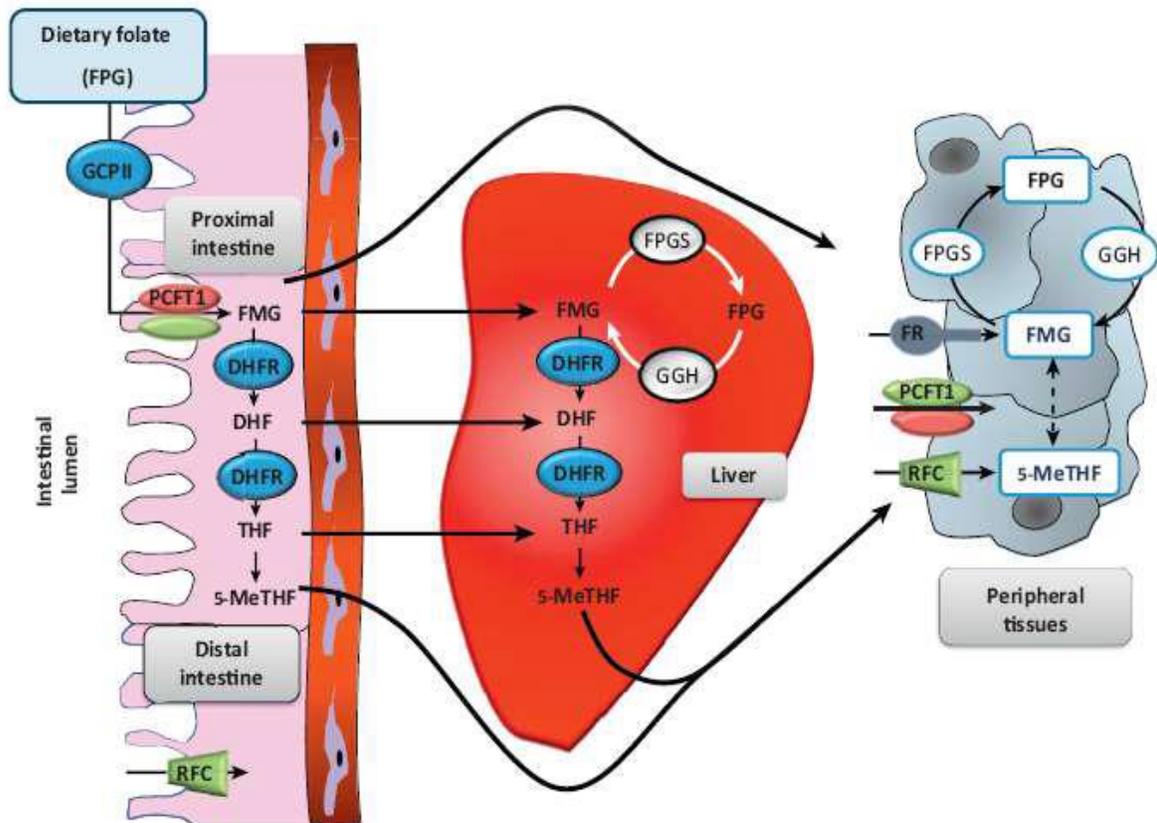


Figure 4 : Absorption et distribution des folates dans le foie et les tissus périphériques (Guéant et al, 2013)

Après hydrolyse en monoglutamate, l'absorption des folates se fait au niveau du jéjunum. Puis, ils traversent la barrière intestinale pour être acheminés vers le foie. Ce cycle est une voie importante de redistribution de la molécule de folate vers les tissus périphériques de l'organisme. Sous l'action de l'enzyme dihydrofolate réductase, l'acide folique se réduit en THF, la forme métaboliquement active. La fixation des groupements méthyles conduit ainsi aux formes circulantes et actives (N5,10-MeTHF et N5-MeTHF). Pour intégrer le cycle folique cellulaire et jouer son rôle comme donneur de méthyles, le 5-MeTHF doit être déméthylé en THF dans le sérum.

vi. Transport :

Dans le sang, les folates sont transportés à travers les membranes cellulaires sous leur forme monoglutamates et sont liés soit à un ligand de faible affinité, l'albumine, soit à un ligand de haute affinité, "Folate Binding Proteins Solubles". Trois systèmes sont impliqués dans le transport des folates :

- Le récepteur de folates réduit (RFC) : c'est un transporteur ubiquitaire mais son expression est plus élevée dans les tissus ayant un rôle dans l'homéostasie des folates et une fonction d'absorption tels que l'intestin, le colon, les tubules rénaux, la membrane plasmique des hépatocytes, les axones et la rate (Wang et al, 2001; Trippett et al, 2001). Son affinité est plus importante pour les folates réduits comme le THF, le N5-méthylTHF, le N5-formylTHF que pour les folates non réduits. Il assure un transport facilité et bidirectionnel des folates (Matherly et Goldman, 2003).
- Les récepteurs de folates (RF) : ils sont exprimés dans le cortex, le placenta, les glandes salivaires, l'utérus, le pancréas, les glandes bronchiques, et les alvéoles pulmonaires. Ils ont été également retrouvés dans des tumeurs et particulièrement dans les carcinomes ovarien et utérin (Parker et al, 2005). Ces récepteurs possèdent une très haute affinité pour l'acide folique et le 5-méthylTHF et internalisent les folates par un mécanisme classique d'endocytose (Salazar et al, 2007).
- Le transporteur de folates couplé aux protons (PCFT) : il est exprimé dans les membranes apicales des cellules intestinales au niveau de jéjunum proximal, dans le rein, le foie, le placenta, la rétine et le cerveau (Qiu et al, 2006; Zhao et al, 2009). Le PCFT est électrogénique et son activité de transport est optimale lorsque le pH est acide (Zhao et al, 2008).

La régulation métabolique des folates dépend de deux processus physiologiques importants : la capacité de captation du tissu qui varie en fonction de la présence des récepteurs des folates et de RFC membranaires et la rétention des folates tissulaires qui est contrôlée par leur « polyglutamylation » (Steinberg, 1984). L'ajout de résidus glutamate permet à la cellule de retenir les folates en limitant leur sortie (Shane et Stokstad, 1985).

vii. Stockage et élimination :

Les cellules hépatiques renferment la moitié des réserves en folates. Les globules rouges en stockent aussi une partie et l'acide folique est récupéré lors de leur destruction (Herbert 1962). Les réserves de notre organisme s'épuisent en 4 mois en moyenne et la quantité totale contenue dans notre corps est faible et est estimée entre 5 à 15 grammes (Herbert 1962). La majorité de l'acide folique est réabsorbé au niveau de l'intestin grêle (cycle entérohépatique). Il est estimé que seulement 0,3 à 0,8% du pool de folates est excrété quotidiennement par voie urinaire et biliaire (Ohrvik et al, 2011).

viii. Le cycle des folates :

Au niveau du cycle des folates, la 5,10-méthylène tétrahydrofolate réductase réduit, grâce au $FADH_2$, le 5,10-méthylènetétrahydrofolate (5,10-MTHF) en 5-méthyltétrahydrofolate (5-MeTHF) (Figure 5). Après transfert de son groupement méthyle à l'homocystéine, le 5-MeTHF est ainsi converti en tétrahydrofolate. Ce dernier va être ensuite transformé en 5,10-MeTHF sous l'action de la sérine hydroxyméthyle transférase ayant le pyridoxal phosphate comme cofacteur et la sérine comme donneur de méthyle. Le 5,10-MeTHF est à son tour converti en 7,8- dihydrofolate (7,8-DHF) grâce à la thymidylate synthase et permet la synthèse de déoxythymidine 5'-monophosphate dTMP à partir de déoxyuridine 5'-monophosphate dUMP. De plus, cette réaction produit également du DHF, lequel devra être régénéré par la dihydrofolate réductase en THF (Lucock, 2000). Enfin, le 5-méthylTHF sert de donneur de groupement de méthyle pour la reméthylation de l'homocystéine (Hcy) en méthionine (Tchantchou, 2006).

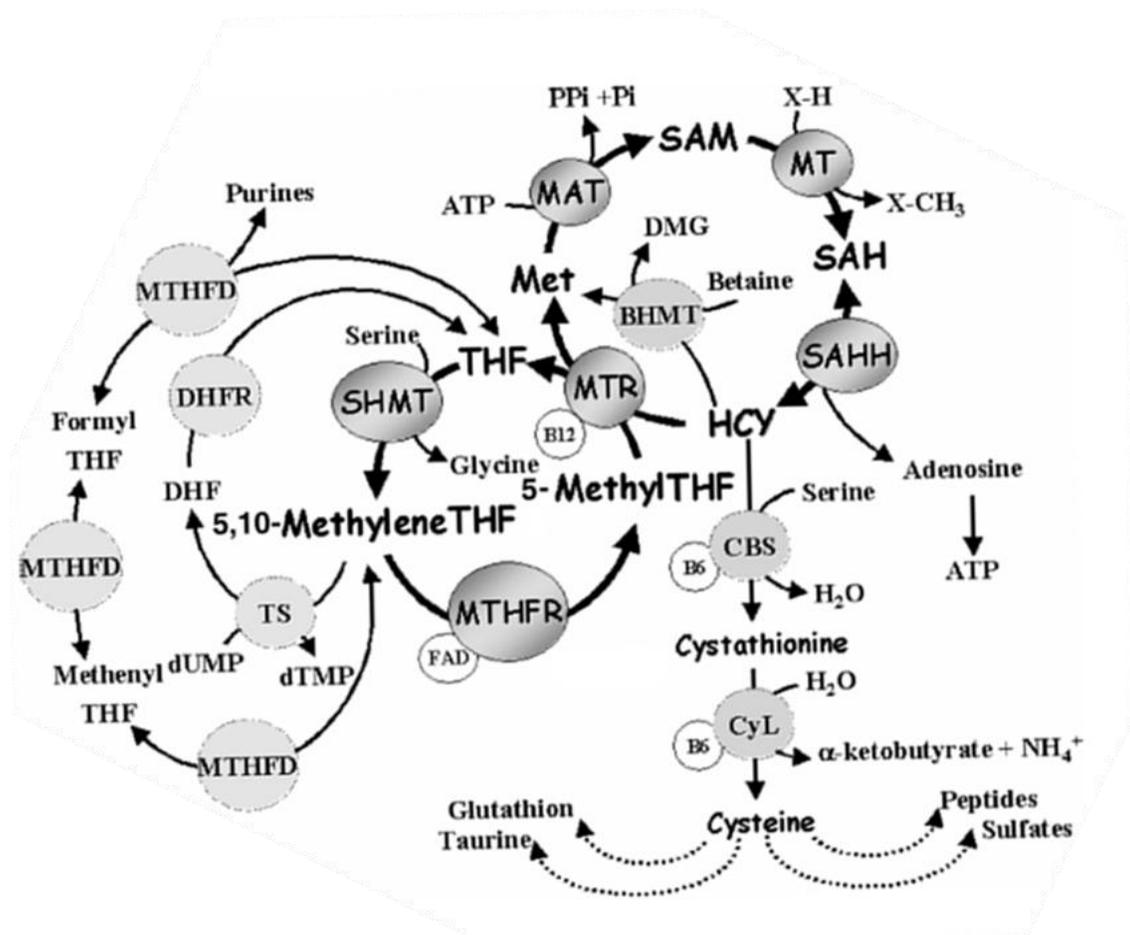


Figure 5 : Cycle de folates et de l'homocystéine (D'après Forges et al, 2007). THF : tétrahydrofolate ; MTR : méthionine synthase ; Met : méthionine ; HCY : homocystéine ; MTHFR : méthylène-tétrahydrofolate réductase ; MAT : méthionine adénosyltransférase ; MT : méthyltransférases ; X : substrat à méthyler ; SAHH : S- adénosylhomocystéine hydrolase ; dUMP : désoxyuridine 50-monophosphate ; dTMP : désoxythymidine 50-monophosphate ; TS : thymidylate synthase; DHFR : dihydrofolate réductase ; MTHFD : 5,10-méthylène-tétrahydrofolate deshydrogénase ; CBS : cystathionine-bêta-synthétase ; CyL : cystathionine lyase.

ix. Rôle des folates :

La vitamine B9 est impliquée dans plusieurs fonctions de l'organisme :

La synthèse de méthionine : cette réaction est catalysée par la méthionine synthase pour

transformer l'homocystéine en méthionine.

La synthèse des bases puriques et de l'acide thymidilique : le N⁵,10-MeTHF et le N¹⁰-formylTHF forment les 2^{ème} et 8^{ème} atomes de carbone du noyau purine. De plus, la réaction de synthèse de la thymidylate est catalysée par la thymidylate synthase ayant le N⁵,10-MeTHF comme cofacteur (Carreras et Santi 1995).

La conversion de la sérine en glycine : c'est une réaction catalysée par la serine hydroxyméthyltransférase (SHMT) pour former la glycine et le 5-formylTHF à partir de la serine (Matthews, Ross et al, 1982).

La dégradation de l'histidine : la réaction de conversion de l'histidine en acide glutamique nécessite la présence de la N⁵,10-MeTHF.

PARTIE II : METABOLISME DES MONOCARBONES ET DONNEURS DE METHYLES

I. Métabolisme des monocarbones :

A. Les substrats :

i. La méthionine :

La méthionine est un acide aminé protéinogénique. Elle est caractérisée par la présence d'un atome de soufre engagé dans une fonction thioéther. De plus, elle est le précurseur de la S-adenosylméthionine (SAM), un métabolite essentiel des réactions de transfert de méthyle dans la cellule.

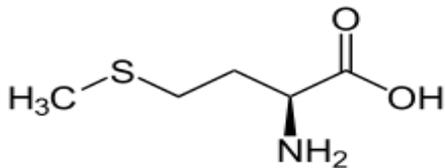


Figure 6 : Structure chimique de la méthionine.

ii. La S-adenosylméthionine :

La S-adenosylméthionine (SAM) est un métabolite essentiellement produit et utilisé dans le foie. Elle est le principal donneur de groupements méthyles nécessaires à la méthylation de l'ADN, l'ARN, des protéines et des lipides. Ces réactions ont pour produit la S-adenosylhomocystéine (SAH).

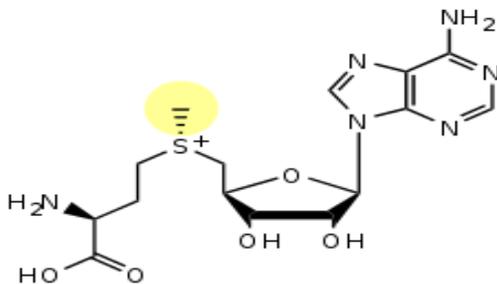


Figure 7 : Structure chimique de la SAM.

iii. La S-adénylhomocystéine :

La S-adényl-L-homocystéine (SAH) est issue de la déméthylation de la SAM. C'est un intermédiaire de la synthèse de la cystéine et de l'adénosine. Cette réaction est catalysée par la SAH-hydrolase (SAHH) et le métabolisme rapide de ces deux métabolites est nécessaire pour empêcher l'accumulation de SAH. Il est important de noter que c'est la seule réaction réversible parmi toutes les réactions chimiques impliquées dans le métabolisme de l'Hcy (Halsted et al, 2002). Des concentrations intracellulaires élevées de ce métabolite accompagnent souvent toutes les formes d'hyperhomocystéinémie (Selhub 1999) puisque la SAH possède une forte capacité d'inhibition de la voie de méthylation et par la suite une accumulation de l'homocystéine au niveau intracellulaire (Figure 8).

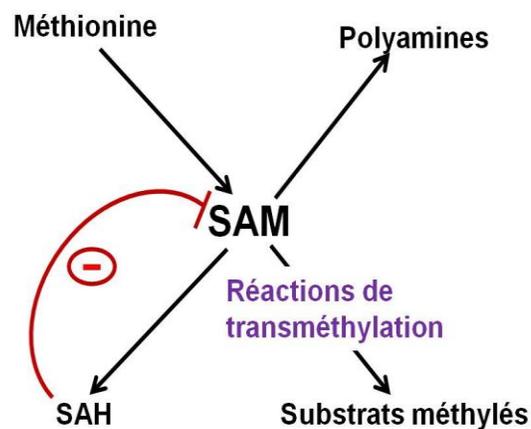


Figure 8 : La SAH est un inhibiteur des réactions de méthylation.

Le rapport SAM/SAH est un indicateur de la capacité cellulaire de méthylation. La SAM joue un rôle important dans la régulation des activités enzymatiques du métabolisme de l'Hcy. L'augmentation de SAM inhibe l'activité enzymatique de la MTHFR, empêchant la reméthylation de l'Hcy (Roblin et al, 2007) et de la cystathionine- β -synthase, favorisant ainsi le catabolisme de l'Hcy (Janosik et al, 2001). Alors que la S-adényl-L-homocystéine est un antagoniste qui empêche le positionnement correct de la SAM sur sa protéine cible et donc du potentiel de méthylation. De plus, des travaux effectués chez des rats soumis à un régime alimentaire pauvre en méthionine, choline, folates et

cobalamine, ont rapporté que la diminution de SAM et l'augmentation de SAH peuvent induire des méthylation anormales impliquées dans le développement de cancers (Poirier et al, 1977 ; Shivapurkar et Poirier, 1983) et accélérer le processus de neurodégénérescence (Duan et al, 2002 ; Liu et al, 2000).

iv. L'homocystéine :

L'homocystéine est un acide aminé non protéinogénique soufré intermédiaire du métabolisme de la méthionine (Figure 9). Chez les adultes sains, la gamme de concentration totale en Hcy dans le plasma est de 5 à 15 $\mu\text{mol/L}$. L'augmentation du niveau plasmatique en Hcy crée une condition appelée hyperhomocystéinémie (HHcy). On distingue classiquement trois catégories d'HHcy : modérée (16 à 30 $\mu\text{mol/L}$), intermédiaire (31 - 100 $\mu\text{mol/L}$) et sévère (> 100 $\mu\text{mol/L}$) HHcy (Cheng et al, 2009). Cet acide aminé est synthétisé par toutes les cellules de l'organisme et peut être recyclé en méthionine ou converti en cystéine selon deux voies métaboliques : la voie de la transsulfuration et la voie de la reméthylation.

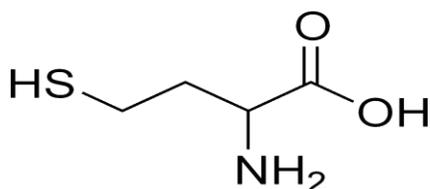


Figure 9 : Structure chimique de l'homocystéine

B. Les voies métaboliques de l'homocystéine :

L'Hcy est un intermédiaire métabolite qui peut être pris en charge d'une part par les voies de méthylation nécessaires pour la synthèse de la méthionine et d'autre part, par la voie de la transsulfuration pour synthétiser la cystathionine.

i. La voie de méthylation de l'Hcy en méthionine :

Dans le cycle de l'Hcy, il y a une conversion de l'Hcy en méthionine. Cette réaction de méthylation acquiert un groupement de méthyle à partir du 5-méthyltétrahydrofolate ou de la bétaine et est catalysée par la méthionine synthase. La voie de méthylation dépend de la biodisponibilité de deux de donneurs de méthyles : la 5-méthyl THF et la méthylcobalamine. Dans les tissus hépatiques et rénaux, cette voie a une alternative pour la reméthylation de l'Hcy, en utilisant comme enzyme la bétain homocystéine méthyltransférase (BHMT), où le groupe méthyle fourni par la bétain est transformée en diméthylglycine (Melse-Boonstra et al, 2005). La méthionine formée peut également être transformée en S-adenosylméthionine, via la méthionine S-transférase adenosylmethionine (MAT). Toutes les cellules vivantes, à l'exception de certains parasites (Merali et al, 2004) expriment différentes formes de la MAT (Glass et al, 2006). Chez les mammifères, il y a trois isoformes de MAT (MATI, II et III), qui sont codées par les gènes *MAT1A* (codant pour la sous-unité MAT1 α qui constitue la MATI sous forme de tétramère et la MATIII sous forme de dimère), *MAT2A* (codant pour la sous-unité catalytique MAT2 α de la MATII) et *MAT2B* (codant pour la sous-unité régulatrice MAT2 β de la MATII). Les MATI et MATIII sont exprimées dans le foie adulte alors que la MAT II est exprimée seulement dans le foie fœtal (Mato et Lu 2007). Par conséquent, les personnes souffrant d'une déficience de l'activité hépatique en MAT sont caractérisées par une hyperméthioninémie persistante isolée (Ubagai, 1995). L'expression du gène *MAT1A* diminue en cas de carcinome hépatocellulaire (CHC) et chez les patients ayant une maladie hépatique (Avila et al, 2000 ; Lee et al, 2004). En revanche, l'expression du gène *MAT2A* et de son analogue *MAT2B* est augmentée en cas de cancer de foie (Cai et al. 1996 ; Martínez-Chantar et al. 2003). Ainsi, l'expression accrue des deux gènes *MAT2A* et *MAT2B* favorise et facilite la croissance cellulaire dans le cancer du foie.

Concernant leurs propriétés cinétiques, MATIII a la plus haute constante de Michaelis (K_m) pour la méthionine (215 μ M - 7 mM). Pour la MATI, elle a une K_m intermédiaire (23 μ M - 1 mM) alors que MATIII a la plus faible K_m (4-10 μ M) (Lu et al, 2000).

ii. La voie de transsulfuration :

Puisque l'Hcy a une tendance à stagner et à s'accumuler dans le sang (Franken, Blom et al, 1996), cet acide aminé toxique doit être catabolisé irréversiblement par la voie de transsulfuration. Cette voie est surtout présente dans les tissus qui nécessitent une forte concentration en glutathion (GSH), comme le foie ou les neurones (Dringen et Hamprecht 1999). Dans cette voie, l'homocystéine est condensée avec la sérine pour former la cystathionine grâce à la cystathionine β -synthase (CBS). La cystathionine est ensuite réduite en cystéine et en α -cétobutyrate au cours d'une réaction catalysée par l'enzyme γ -cystathionase. Le pyridoxal 5'-phosphate, qui est la forme active de la vitamine B6, est le cofacteur de ces deux dernières réactions. La cystéine peut notamment être un constituant du GSH, ou bien un antioxydant intracellulaire majeur, ce qui confère à la voie de transsulfuration un rôle majeur dans la régulation du stress oxydatif.

C. Les facteurs favorisant une hyper-homocystéinémie :

i. Facteurs environnementaux :

L'homocystéinémie augmente avec l'âge et chez les hommes comparativement aux femmes après l'âge de 10 ans. Ceci peut être expliqué par la différence dans la masse musculaire et aux effets des hormones sexuelles. Cette augmentation de l'homocystéinémie continue graduellement tout au long de la vie et peut être liée au déclin de la fonction rénale et au statut en vitamine B chez les personnes âgées (Norlund et al, 1998). De plus, l'HHcy a été associée à quelques conditions physiopathologiques, telles qu'un désordre hépatique, une insuffisance rénale (Bostom et al, 1997 ; Guillard et al 2003), un hypothyroïdisme ainsi que plusieurs types de cancers (Singal et al, 2004 ; Kothekar, 2007). Par ailleurs, la prise de certains médicaments comme la carbamazépine, la théophylline et les cyclosporines interfèrent avec l'absorption des vitamines B9, B6 et B12, et provoquent une augmentation modérée de l'homocystéinémie (Guillard et al, 2003 ; Kothekar, 2007).

ii. Facteurs génétiques :

Les polymorphismes génétiques des enzymes clés intégrées dans le métabolisme de l'Hcy, notamment la méthylènetétrahydrofolate réductase, la méthionine synthase (MS) et la cystathionine- β -synthase (CBS) peuvent affecter le statut en Hcy et conditionnent les besoins nutritionnels relatifs de la population concernée en vitamines du groupe B (Bottiglieri, 2005). Soixante-dix déterminants génétiques ont été identifiés (Sharma et al, 2006 ; Kullo et al, 2006). Il s'agit principalement de deux mutations 677C/T et 1298A/T au niveau du gène codant pour la MTHFR (Weisberg et al, 1998), la mutation du gène codant pour la CBS et dont la forme homozygote conduit à un cas d'HHcy sévère (Ubbink et al, 1995 ; Vesin et al, 2007), et la mutation 2756A/G du gène *MTR* qui code pour la méthionine synthase (Chango et al, 1999).

iii. Facteurs nutritionnels :

Le taux d'Hcy peut être accru suite à un déficit d'apports de déterminants nutritionnels dont les plus couramment cités sont les folates, la cobalamine, la vitamine B6, la choline et moins souvent la vitamine B2. Diverses études observationnelles ont confirmé l'existence d'une relation inverse entre les apports en vitamines du complexe B et l'homocystéinémie (Stea et al, 2008 ; Sachadyn et al, 2008). Il existe 3 types de déficiences en vitamine B associées à une accumulation d'Hcy : l'interruption de la voie de transsulfuration par une déficience en coenzymes dérivés de la phosphate de pyridoxal (une des sept formes de la vitamine B6), la carence en folates qui sont les donneurs de méthyle dans la réaction de conversion d'Hcy en méthionine (De Bree et al, 2001), et enfin la carence en cobalamine qui a pour conséquence une réduction de la voie de reméthylation de l'Hcy allant même jusqu'à une déficience fonctionnelle en folates, appelée "le piège à folates" (Herrmann et al, 2003). La consommation d'alcool et de café, le tabagisme actif, ainsi que le manque d'activité physique peuvent, eux aussi, augmenter le taux plasmatique d'Hcy (Refsum et al, 1998; Faeh et al 2006).

iv. Facteurs pharmacologiques :

La prise de certains médicaments peut interagir avec le métabolisme des monocarbones et en provoquant des carences et une hyperhomocystéinémie. En effet, le phénobarbital, les contraceptifs oraux (Shojania et al, 1968), les antidiabétiques (sulfamides), les antibiotique Bactrim®, ainsi que le méthotrexate, un antagoniste de l'acide folique, sont considérés comme une cause potentielle d'hyperhomocystéinémie (Jolivet et al, 1987).

PARTIE III : LES PROTEINES MS, MSR, MMACHC et MMADHC IMPLIQUEES DANS LE METABOLISME DE LA COBALAMINE :

I. La méthionine synthase :

Le gène humain de la méthionine synthase (*MTR*) se situe sur le chromosome 1 en position 1q43 (Li et al, 1996). La région codante du gène *MTR* est composée de 33 exons et de 32 introns et code pour le transcrit MTR-001. Le gène *MTR* code pour une protéine de 1265 acides aminés pour un poids moléculaire prédit de 140 kDa. La région 5' non codante correspond aux positions c.394 à c.1 alors que la région 3' non codante correspond aux positions c.1 à c.6337. L'épissage alternatif du gène *MTR* donne lieu a une diversité de transcrits (Figure 10) dont cinq (MTR-001, MTR-002, MTR-201, MTR-202 et MTR-203) codent pour la synthèse d'une protéine alors que les deux autres transcrits (MTR-003 et MTR-004) ne sont pas codants (Fofou-Caillierez et al, 2013).

A. Les transcrits alternatifs de *MTR* :

i. Le transcrit MTR-201 :

La région codante du transcrit MTR-201 contient 31 exons et de 30 introns. Il code pour une protéine tronquée de 1214 aa avec un poids moléculaire théorique de 134.8 kDa selon la base de données Ensembl : (http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/ProteinSummary?db=core;g=ENSG00000116984;r=1:236795281236903981;t=ENST00000535889). Cette protéine n'est pas active et partage une très grande homologie avec la protéine fonctionnelle. Elle se distingue de MTR-001 par trois exons manquants : 16, 17 et 18 et qui appartiennent au domaine de liaison et d'activation du N5-méthyltétrahydrofolate. Il y a un exon supplémentaire après la partie codante de l'exon 33. Cet exon correspond à 37 pb de la région 3' non codante du transcrit allant de la position c.2512 à la position c.2549 inclus (Fofou-Caillierez et al, 2013)

ii. Le transcrit MTR-002 :

La région codante du transcrit MTR-002 contient 20 exons et 18 introns. Le transcrit commence dans l'exon 14 situé en position c.1258. Dans l'exon 15, 71 paires de bases, situées entre les positions c.1436 à c.1507, sont absentes. Le transcrit se termine dans la région 3' non codante en position c.2774. Le poids moléculaire de la protéine de 819 aa codée par ce transcrit est de 91.8 kDa. Elle ne possède ni de domaine de liaison avec l'homocystéine ni de domaine de liaison et d'activation de la 5-CH₃-THF (Fofou-Caillierez et al, 2013).

Transcrits de MTR	Taille des transcrits	Nombre d'exons	Taille de la protéine (aa)	Poids moléculaire de la protéine (kDa)
MTR-001	10529	33	1265	140.5
MTR-002	5234	20	819	91.8
MTR-201	10405	32	1214	134.8
MTR-003	4175	3	-	-
MTR_004	1972	17	-	-

Tableau 3. Récapitulatif des transcrits de *MTR* et de leurs propriétés. a.a: Acides aminés, KDa : kilodalton, pb : paire de bases

iii. Les transcrits MTR-003 et MTR-004 :

Le transcrit MTR-003 comporte 3 exons. Il est composé des exons 32, 33 et des 2765 premières bases de la région 3' non codante situées dans les positions c.3203 à c.2765 du transcrit MTR-001. Entre les exons 32 et 33 du transcrit MTR-003, 796 paires de bases supplémentaires sont insérées. Le transcrit MTR-004 est formé de 17 exons. Il correspond aux parties allant des positions c.89 à c.339 et c.409 à c.1953 du transcrit MTR-001 correspondant aux exons 1 à 3 et 5 à 18 du transcrit MTR-001. Les deux

transcrits MTR-003 et MTR-004 ne codent pas pour une protéine.

B. La protéine MS :

La MS est principalement exprimée dans le cœur, le pancréas, le muscle squelettique, le thymus, la prostate, les testicules, les ovaires et le petit intestin. Les études faites sur la méthionine synthase, issue du gène *metH* chez la bactérie *Escherichia coli*, fournissent une base de connaissance importante et plus avancée que celles faites sur la MS humaine. Le produit de ce gène est une enzyme B12-dépendante qui utilise surtout l'acide folique monoglutamate comme substrat. Pour son activation, cette enzyme requiert une méthylation réductrice SAM-dépendante et un donneur d'électron (Foster et al, 1964).

La MS humaine a une homologie de 55% avec celle d'*E.coli* et de 66% avec la méthionine synthase issue de *Caenorhabditis elegans* (Gulati et al,1996). Le gène *MetH* de *E.coli* a été cloné et sa séquence a été identifiée. Cette protéine présente des propriétés catalytiques très similaires à celles de MS des mammifères (Banerjee et al, 1990). Comme mentionné auparavant, la MetH catalyse la réaction de transfert du groupement méthyle de la MeCbl vers l'homocystéine pour former la méthionine et la cob(I)alamine. Cette dernière est reméthylée par le 5-méthyltétrahydrofolate pour régénérer la méthylcobalamine et le tétrahydrofolate. Le cofacteur cobalamine passe occasionnellement de sa forme active réduite (cob(I)alamine) à sa forme inactive oxydée (cob(II)alamine) (Drummond et al, 1993).



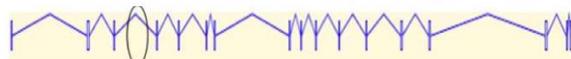
MTR-001, 33 exons, 10529 bp encoding 1265 aa



MTR-002, 20 exons, 5234 bp encoding 819 aa



MTR-201, 31 exons, 3780 bp encoding 1118 aa



MTR-004, 17 exons, 1972 bp



MTR-003, 3 exons, 4 175 bp

Figure 10 : Produits d'épissage alternatif prédits par la base de données www.ensembl.org/ de EMBLEBI et Sanger Centre.

Les transcrits qui codent pour des protéines fonctionnelles sont en jaunes. Ceux codant des protéines de fonction inconnue sont en rouges. Et ceux ne codant pas de protéines sont en bleus. Les exons manquants dans les autres transcrits en utilisant le transcrit MTR-001 comme transcrit de référence sont entourés par des ellipses. Les barres horizontales indiquent les amplicons produits par RT-PCR pour l'analyse de l'épissage.

Chez E.coli, la réactivation de la forme inactive cob(II)alamine de la MS utilise la flavodoxine réduite comme donneur d'électrons et l'AdoMet comme donneur de groupement méthyle. Chez les humains, le recyclage de la cob(II)alamine est catalysé par la méthionine synthase réductase (MSR) qui lui procure un électron du NADPH (Yamada et al, 2006).

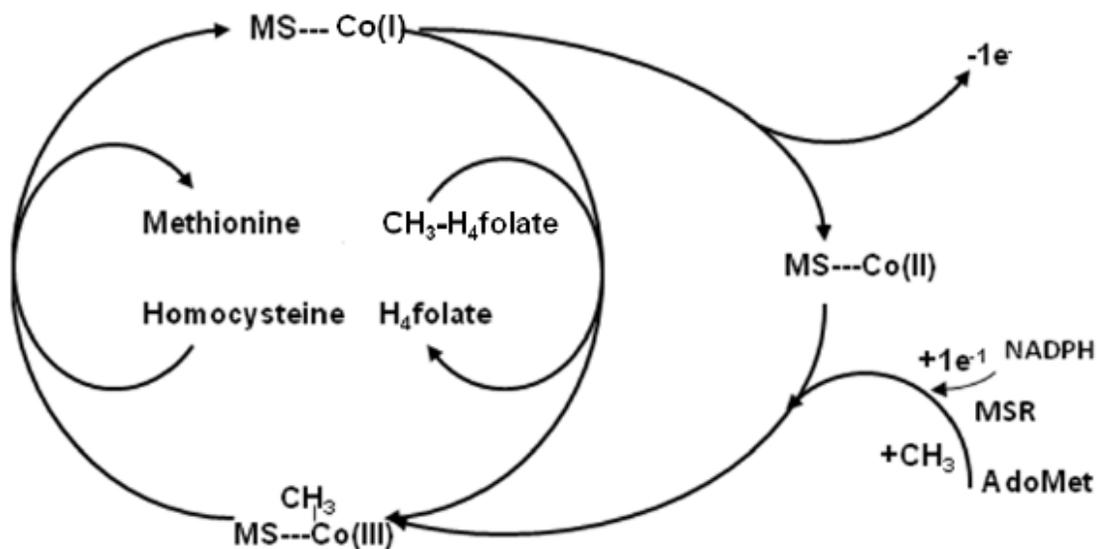


Figure 11 : Schéma illustrant le cycle catalytique et la réactivation de la MS.

Au cours du cycle catalytique, la MS transfère le groupement méthyle du 5-méthylTHF à la cob(I)alamine pour former le méthylcob(III)alamine. La régénération de MS nécessite un électron de NADPH catalysée par la MS et le transfert du groupement méthyle de SAM

C. Les modules fonctionnels de la MS :

La plupart des connaissances structurales et fonctionnelles concernant la méthionine synthase découlent de la recherche sur la MetH de E.coli (Drennan et al, 1994) et de

l'homme (Ludwig et Matthews, 1997). La méthionine synthase est une enzyme composée de 5 domaines modulaires (Figure 12) (Dixon et al, 2000 ; Evans, 2004). De l'extrémité N-terminale vers l'extrémité C-terminale, le produit du gène MetH est constituée des deux domaines de liaison pour l'homocystéine et le 5-méthylTHF, le cap, et des deux domaines de liaisons pour la cobalamine et la SAM (Drennan et al, 1994 ; Dixon et al, 1996 ; Koutmos et al, 2009).

Les deux premiers domaines de liaison, pour l'homocystéine et le méthyltétrahydrofolate, se trouvent sur le fragment N-terminal de 70 kDa. Le domaine de liaison de l'homocystéine comporte les acides aminés 2 à 353 et celui de la 5-méthylTHF est composé des résidus 354-649 (Goulding et al, 1997). L'analyse cristallographique de la méthionine synthase de la bactérie *Thermotoga maritima* ont montré que ces deux domaines de liaisons sont constitués de deux barils ($\beta\alpha$)₈, intimement associés l'un à l'autre même durant le processus catalytique. Les sites actifs des domaines de liaison de l'Hcy et de la 5-méthylTHF sont situés sur l'extrémité de la partie C-terminale des brins des deux barils et séparés d'une distance égale à 50 Å (Angström) (Evans et al, 2003).

Le troisième site de liaison avec la cobalamine est situé sur un fragment de 28 kDa et est constitué des résidus 650-896 (Banerjee et al, 1989 ; Drennan et al, 1994). Ce module de liaison est formé de deux domaines. Le premier est le domaine Cap, formé de quatre hélices situées sur la partie supérieure (β) de la cobalamine. Le deuxième domaine est le domaine de Cob ou de Rossmann α/β et interagit avec la face intérieure du groupe prosthétique de l'enzyme. Pour compléter le processus catalytique, ce domaine doit faire des allers-retours entre les sites actifs des domaines de liaisons de l'Hcy et de la 5-méthylTHF (Evans et al, 2003).

Le quatrième domaine de la MS se trouve sur l'extrémité C-terminale de 38 kDa et comporte les acides aminés 897-1227 (Drummond et al, 1993). Ce domaine est essentiel à la réactivation de la forme oxydée de la cobalamine (cob(II)alamine) de la MS (Goulding et al, 1997).

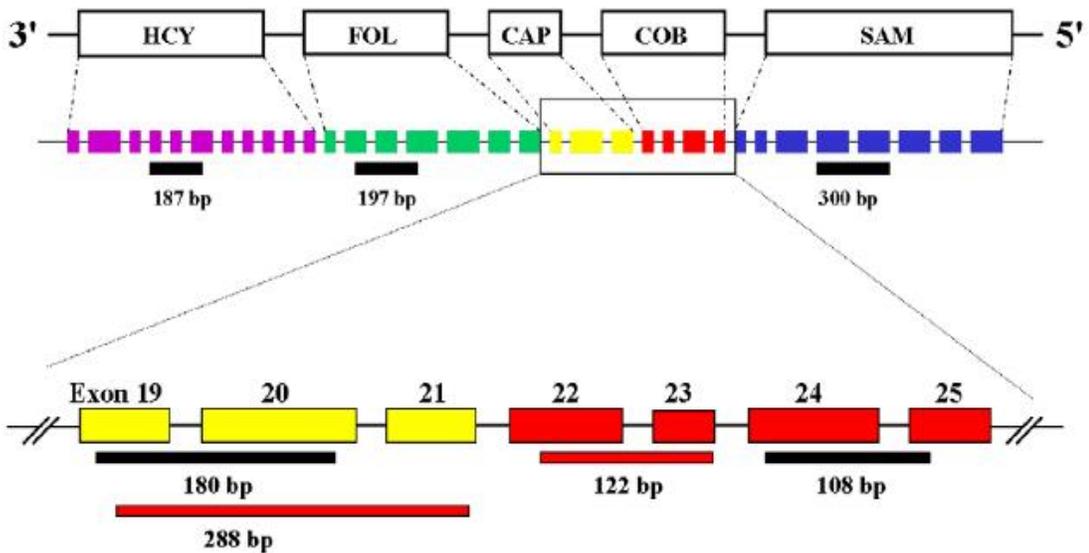
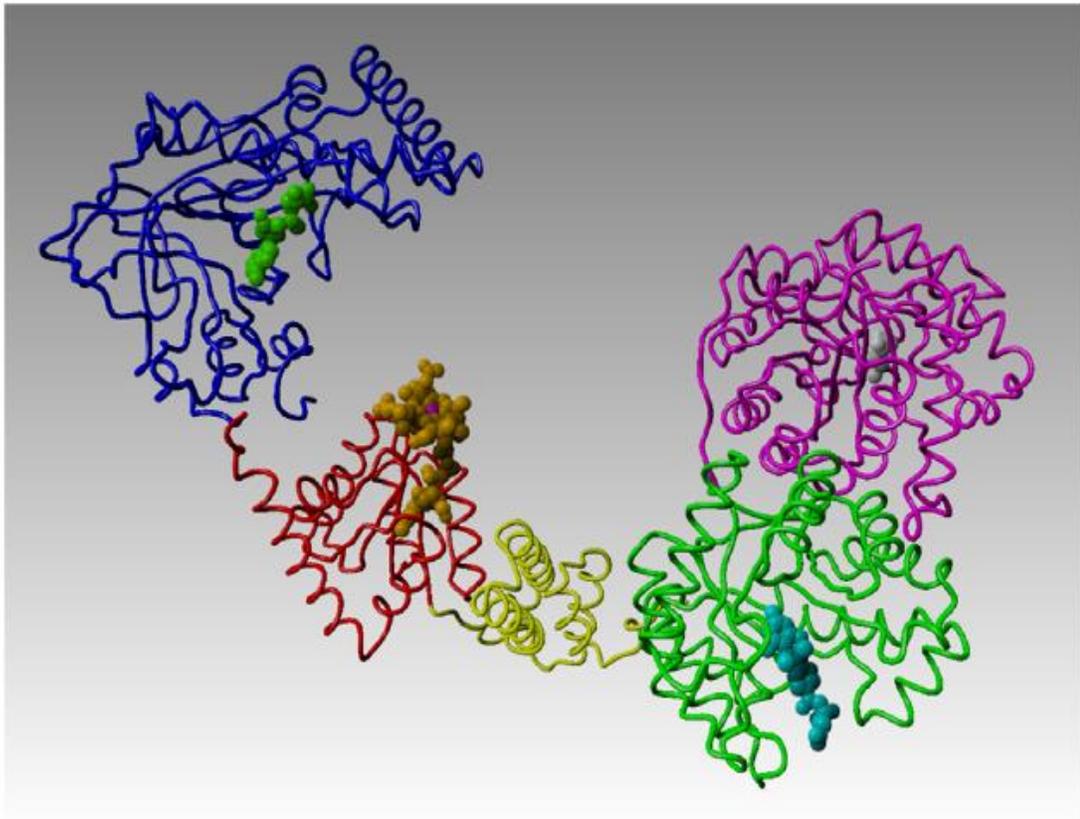


Figure 12 : La structure et la composition des exons des domaines de liaison de la MS (Muratore et al, 2013).

La MS est composée de cinq domaines modulaires: domaine de liaison avec l'Hcy (violet), domaine de liaison avec le 5-méthylTHF (vert), le domaine de liaison Cap (jaune), le domaine de liaison de la Cbl (rouge) et le domaine de liaison avec SAM (bleu). Le gène MTR chez l'homme est constitué de 33 exons comportant ces domaines selon un ordre séquentiel.

En se basant sur la structure de la MS, des changements conformationnels sont essentiels pour les réactions de transfert du groupement méthyle. Dans l'état conformationnel de repos de la MS, le domaine Cap protège le méthyle de la MeCbl des réactions entre les substrats et les solvants (Jarret et al, 1996). Pendant l'état conformationnel rotatif, le décalage du domaine Cap va permettre à la région de liaison et d'activation des substrats située sur le fragment N-terminal de se lier à la cobalamine et par la suite d'effectuer les réactions de transfert de groupement méthyl. Quand la cob(I)alamine endogène est oxydée en cob(II)alamine, la région de liaison du substrat de la partie N-terminale revient à sa position de repos et le domaine de liaison de SAM du fragment C-terminal sera située au-dessus de la cobalamine endogène pour permettre à l'adénosylméthionine de reméthyliser le groupement prosthétique de la cobalamine. C'est l'état conformationnel actif de MS (Goulding et al, 1997).

II. Méthionine synthase réductase :

A. Généralités :

La méthionine synthase réductase est une double flavoprotéine oxydoréductase (Gherasim et al,2008), impliquée dans la réactivation par reméthylation réductrice de la méthionine synthase en utilisant la SAM comme donneur de groupement méthyl. Le gène *MTRR* est localisé sur le chromosome 5p15.2-15.3 (Wolthers et al, 2003). Le cadre de lecture est composé de 15 exons et de 14 introns. Ce gène code pour une protéine contenant 698 acides aminés de poids moléculaire de 77.7 kDa. Ce gène partage une homologie de 38% avec la cytochrome P450 réductase (*POR*) chez l'homme (Galkin et al, 1977).

B. La fonction et les propriétés moléculaires de la MSR humaine :

La méthionine synthase réductase est une protéine soluble, monomérique et appartient à la famille des diflavines réductases (Massey et al, 1980). La structure primaire de la

méthionine synthase réductase montre que cette enzyme est composée de deux domaines de liaison : le domaine de liaison de NADPH/FAD (flavine adénine dinucléotide) et le domaine de liaison FMN (flavine mononucléotide). Le premier domaine de liaison est constitué des acides aminés 163-698 alors que le deuxième domaine de liaison de la FMN est de 30 kDa et comporte les résidus 1-233. Selon la séquence primaire la protéine MSR, le site de liaison du NADPH/FAD est situé à l'extrémité C-terminale de la protéine alors que celle de FMN à l'extrémité N-terminale (Leclerc et al, 1998).

C. Interaction entre MSR et MS chez l'homme :

La cobalamine est une vitamine de faible abondance et de réactivité réduite, et se trouve presque exclusivement (95%) liée à une protéine dans la cellule (Kolhouse et al, 1977). Les interactions protéiques entre les enzymes dépendantes de la vitamine B12 jouent un rôle crucial dans le métabolisme de la cobalamine. Dans le mécanisme de réactivation de la MS, un complexe est formé entre la méthionine synthase et la méthionine synthase réductase. Les électrons provenant de l'oxydation de la NADPH, catalysée par MSR, sont transférés à la forme inactive de MS (Olteanu et al, 2001 ; Leclerc et al, 1999). Le domaine d'activation situé sur l'extrémité C-terminale de la MS humaine interagit avec le domaine de liaison de FMN de la MSR. Ce complexe facilite le transfert du groupement méthyle de l'AdoMet vers la MS. L'analyse du modèle moléculaire de la MSR et du domaine actif de la MS suggère que l'interaction électrostatique peut être importante pour former le complexe. Différentes études ont confirmé cette hypothèse par des techniques d'analyse chimique de réticulation protéique du complexe. Ces données suggèrent que des résidus acides sur la surface du domaine FMN de la MSR interagissent électrostatiquement avec des résidus basiques sur la surface du domaine actif de la MS (Wolthers et al, 2007). Concernant les caractéristiques thermodynamiques de ce complexe, des études ont montré que lors de l'interaction, des changements conformationnels se produisent. Ces changements sont accompagnés d'une augmentation de l'énergie totale et une diminution de l'entropie (Wolthers et al, 2007).

En 2007, Wolthers et Scrutton ont proposé un modèle des mouvements qui se font au sein des 2 protéines MS et MSR permettant à la MSR de régénérer la MS (Figure 13). Ce

modèle montre que la MSR peut fluctuer entre une conformation fermée et ouverte. Durant la conformation ouverte, le domaine de liaison de la FMN est susceptible d'interagir avec la MS alors que durant la conformation fermée, le domaine de liaison de la FMN est à proximité du domaine de liaison de NADPH/FAD (Wolthers et Scrutton 2007).

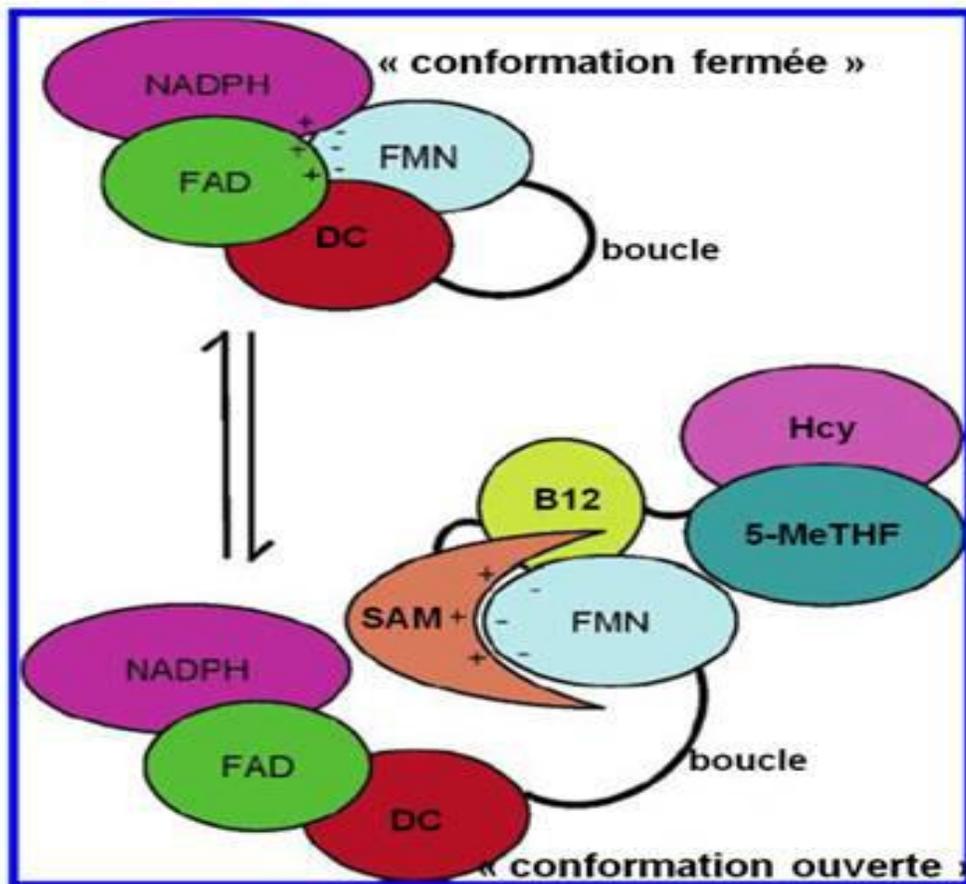


Figure 13 : Modèle présentant les conformations ouverte et fermée de la MS (Wolthers et Scrutton, 2007).

Dans la conformation fermée, le domaine de liaison de la FMN est lié au module semblable au FNR (fumarate and nitrate reduction regulator) de la MSR dans une position qui permet un transfert d'électron. Dans la conformation ouverte, le domaine de liaison de la FMN s'est déplacé du restant du polypeptide MSR et se trouve dans une conformation propice pour interagir avec la MS. Les interactions électrostatiques sont représentées par les symboles + et -. Elles sont vraisemblablement importantes à l'interface entre le domaine de liaison de la FMN et le module semblable au FNR et aussi

du domaine de liaison de la SAM ou domaine d'activation de la MS. DC est le domaine de connection de la SR, alors que l'Hcy, le 5-MeTHF et la vitamine B12 représentent respectivement les domaines de liaison de l'homocystéine, du 5-méthyltétrahydrofolate et de la cobalamine.

III. La protéine MMACHC :

Le gène *MMACHC* code pour une protéine cytoplasmique de 282 acides aminés et de poids moléculaire de 31.7 kDa. Certains motifs de la protéine MMACHC ont une homologie avec des structures protéiques bactériennes ayant des fonctions liées à la cobalamine. Les résidus 118-138 de MMACHC et les résidus 629-642 de la protéine méthylmalonylCo-A mutase de *Streptomyces avermitilis*, appartenant à son domaine de liaison de la Cbl, sont identiques à 52%. Les résidus 181-282 de MMACHC sont similaires à diverses protéines TonB des bactéries de Gam négatif et les résidus 242-280 de MMACHC sont identiques à 52% des acides aminés 119-156 de la bactérie *Salmonella typhimurium* (Lerner-Ellis et al, 2005). L'épissage alternatif du gène génère deux protéines dont une version tronquée des résidus 1-40 de la partie C-terminale. La forme tronquée est la forme prédominante chez la souris (Koutmos et al, 2011).

La protéine MMACHC possède la capacité de se lier à différentes formes de la cobalamine ayant des ligands en position axiale supérieure (AdoCbl, MeCbl, CNCbl, et HOCbl) ainsi qu'à d'autres formes alkylées (Kim et al, 2008 ; Froese et al, 2009 ; Koutmos et al, 2011). Des données récentes ont suggéré que MMACHC peut être localisée dans la mitochondrie (Pagliarini et al, 2008). MMACHC joue un rôle de catalyseur dans la réaction de décyanation de la CNCbl pour former la cob(II)alamine en présence de donneurs d'électrons NADPH et FMN/FAD. Cette protéine est aussi responsable de la déalkylation des dérivés de cobalamine tels que l'AdoCbl et le MeCbl en présence du glutathione réduit (Hannibal et al, 2009 ; Kim et al, 2009).

A. Complexe entre MMACHC et MS :

Il a été démontré que la protéine MMACHC interagit avec d'autres protéines impliquées dans la voie métabolique de la cobalamine, tels que la MS. En 2013, Fofou-Caillierez et

al, ont mis en évidence le complexe MS/MMACHC. Les techniques de co-immunoprécipitation et d'analyse des interactions MS/MMACHC ont été réalisées sur des fibroblastes témoins, et de patients cblC, cblG et cblG-variant. Ils ont pu démontrer que MMACHC interagit non seulement avec l'isoforme fonctionnel de la MS (140 kDa) mais aussi avec sa forme tronquée (124 kDa) codée par le transcrit MTR-201. L'interaction entre MMACHC et les isoformes de la MS joue un rôle important dans l'orientation de la Cbl vers la voie de synthèse de MeCbl ou vers la voie de synthèse d'AdoCbl. Fofou-Caillierez et al, ont proposé une modélisation par homologie de la structure de la MS humaine grâce à l'utilisation du logiciel Molecular Integrated Development Environment (MolIDE), puis l'arrimage du complexe MMACHC/MS générée par le serveur ClusPro. Ils ont aussi analysé l'interface d'interaction entre la MS et MMACHC en utilisant le logiciel BRUGEL. Le domaine d'interaction de la MS avec MMACHC (Figure 14) s'étendrait principalement sur deux séquences linéaires, des résidus 688-706 et des positions 745 à 768. Les liaisons d'hydrogène intermoléculaires formées dans le complexe MMACHC/MS impliqueraient spécifiquement les résidus, Arg-161 et Arg-206, de la MMACHC. Les liaisons d'hydrogène des arginines 161 et 206 interviendraient toutes dans la stabilisation du complexe d'interaction MMACHC/MS et leurs contributions énergétiques seraient quasi équivalentes.



Figure 14 : Modélisation de l'interaction MS/MMACHC (Fofou-Caillierez et al, 2013).

IV. La protéine MMADHC :

La protéine MMADHC, codée par le gène *MMADHC* situé sur le chromosome 2q23.2, est formée de 296 résidus avec un poids moléculaire de 32.9 kDa (Coelho et al, 2008). Elle possède une certaine homologie avec la famille des transporteurs à ATP Binding Cassette (ABC), mais elle ne contient pas les motifs de liaisons à l'ATP tels que le Walker A, le Walker B ni le motif ABC, caractéristique de cette famille de protéines (Coelho et al, 2008). Cette protéine contient des domaines fonctionnels nécessaires pour guider la cobalamine vers la mitochondrie pour la synthèse de l'AdoCbl ou vers le cytoplasme pour la synthèse de la MeCbl (Stucki et al, 2012). La partie N-terminale de MMADHC (1-118 acides aminés) contient une séquence de ciblage mitochondrial, et est indispensable à la voie de synthèse de l'AdoCbl mitochondriale (Stucki et al, 2012 ; Jusufi et al, 2014). Les 180 acides aminés de l'extrémité C-terminale de MMADHC sont engagés dans les deux voies, mitochondriales et cytoplasmiques alors que les deux régions de 197-226 résidus et de 246-259 acides aminés sont plus importantes pour la voie cytoplasmique que pour la voie mitochondriale (Froese et al, 2015). La séquence de MMADHC contient un motif qui a été initialement défini comme étant proche du domaine de liaison avec la cobalamine composé des résidus 81-86, mais aucune étude n'a pu montrer de liaison avec la Cbl (Coelho et al, 2008 ; Deme et al, 2012).

Malgré la découverte du gène *MMADHC* depuis huit ans, les propriétés biochimiques et les fonctions physiologiques de la protéine MMADHC sont loin d'être totalement élucidées.

V. Le complexe MMADHC-MMACHC :

Malgré son rôle dans la régulation de livraison de la cobalamine vers l'une des deux voies de synthèse de MeCbl ou d'AdoCbl, l'incapacité de MMADHC à se lier à la Cbl a conduit à l'hypothèse d'une interaction protéique avec MMACHC (Deme et al, 2012). En 2011, le groupe de D. Rosenblatt a été le premier à démontrer *in vitro* la formation d'un complexe entre MMACHC et MMADHC par la méthode de résonance plasmonique de surface (SPR), par le système double-hybride bactérien et par la technique de Native PAGE (Électrophorèse sur gel de polyacrylamide natif) (Plesa et al, 2011). Seule la partie

C-terminale jusqu'au résidu 154 de la protéine MMADHC est nécessaire pour l'interaction avec MMACHC (Froese et al, 2015). Des mutations au niveau des gènes correspondants peuvent perturber la formation de ce complexe. Cette perturbation se traduit par une incapacité à livrer la cobalamine à la méthionine synthase et à Mut (Plesa et al, 2011 ; Stucki et al, 2012).

PARTIE IV : LES DEFAUTS GENETIQUES DU TRANSPORT, DE L'ABSORPTION ET DU METABOLISME DE LA VITAMINE B12

Plusieurs défauts génétiques affectant l'absorption, le transport ou la synthèse intracellulaire des cobalamines, ont été identifiés (Figure 17). Ces troubles sont transmis sur le mode autosomique récessif. Ces maladies se révèlent habituellement dans les premières années de vie par des anomalies hématologiques, un retard de développement, une atteinte neurologique et des difficultés d'alimentation. Parfois, la maladie débute plus tardivement chez l'adolescent ou l'adulte avec une présentation qui peut être exclusivement neuropsychiatrique.

I. Défauts génétiques de l'absorption et du transport de la vitamine B12 :

Les troubles de malabsorption héréditaires de la cobalamine peuvent être causées par des mutations germinales dans les gènes qui codent pour l'haptocorrine, le FI, la TC et le récepteur de la transcobalamine (TCblR).

A. Déficience du facteur intrinsèque :

Le déficit congénital en facteur intrinsèque (DCFI) est un trouble rare de l'absorption de la vitamine B12 qui se transmet par le mode autosomique récessif. Il est dû à l'absence de sécrétion ou à la non fonctionnalité du facteur intrinsèque. Ce dernier est une protéine formée de 417 acides aminés et codée par le gène *GIF* (Yassin et al, 2004). Des mutations peuvent abolir la production de ce facteur, diminuer son affinité pour la cobalamine ou même augmenter sa sensibilité à la protéolyse (Tanner et al, 2005). Le FI possède un poids moléculaire de 45 kDa mais il peut atteindre 58-60 kDa après glycosylation (Guéant et al, 1985). En absence du facteur intrinsèque, l'absorption de Cbl par les cellules iléales devient inefficace (<1% de Cbl est absorbé) (Fowler, 1998). Ceci provoque une diminution du taux de cobalamines plasmatiques disponibles pour la synthèse de MeCbl et d'AdoCbl et par la suite une diminution de l'activité enzymatique de *Mut* et de MS. Cette anomalie est caractérisée par une anémie mégaloblastique, des

troubles neurologiques (une neuropathie périphérique, une dégénérescence combinée subaiguë de la moelle épinière et/ou une ataxie) et un déficit en cobalamine avec hyperhomocystéinémie et acidémie méthylmalonique (Tableau 4) (Watkins et al, 2011). A ce jour, dix mutations du gène *GIF* sur le chromosome 11q12 ont été identifiées tels que la mutation c.290C>T (p.M97T) et la mutation c.435-437delGAA (p.K145-N146delinsN). Des études de séquençage complet du génome humain ont mis en évidence des centaines d'autres variants génétiques. Durant le processus de sécrétion, le FI est fucosylé par l'enzyme sécréteur FUT2 (fucosyltransférase 2). Ce mécanisme pourrait expliquer l'aggravation du statut en vitamine B12 par le variant sécrété de la FUT2 en altérant la sécrétion du facteur intrinsèque dans les cas de mutation hétérozygote du *GIF* (Chéry et al, 2013).

Le diagnostic de cette anomalie se fait par le test de Schilling pour mesurer l'absorption intestinale de la vitamine B12 marquée. Ce test repose sur l'administration orale de cobalamine marquée et suivie par une injection intramusculaire de vitamine B12 non marquée pour saturer les récepteurs et par suite chasser les radiomarqueurs dans les urines. La radioactivité urinaire est ensuite dosée au cours de 24 heures suivantes. Les patients ayant un DCFI montrent une diminution d'excrétion de taux de cobalamine marquée (<11%) due à la malabsorption iléale de la cobalamine (Banner et al, 2005). Ce test est coûteux, invasif, et rarement disponible aujourd'hui (Ferrand, 2015). Le traitement médical consiste en des injections intramusculaires hebdomadaires ou mensuelles d'hydroxocobalamine ou de cyanocobalamine, jusqu'au rétablissement complet des réserves en cobalamine (Rosenblatt et Fowler, 2006).

B. Imerslund-Gräsbeck :

Le syndrome d'Imerslund-Gräsbeck (IGS) ou anémie mégalo-blastique héréditaire de type 1, est une cause rare de carence en vitamine B12 qui se transmet par le mode autosomique récessif. Les symptômes apparaissent entre l'âge de 1 à 5 ans avec un retard de croissance, une anémie mégalo-blastique, une protéinurie fréquente, des anomalies anatomiques des voies urinaires et une réabsorption rénale déficiente, occasionnellement accompagnées par des complications neurologiques (Watkins et Rosenblatt, 2011). La forme tardive de cette maladie a été aussi rapportée. Comme mentionné antérieurement,

cette maladie est causée par des mutations sur le gène de la cubiline (*CUBN*) situé sur le chromosome 10p12.1 ou le gène de la protéine amnionless (*AMN*) situé sur le chromosome 14q32 (Guéant et al, 1995 ; Gräsbeck, 2006). Ces mutations ont pour conséquence une diminution de l'activité de liaison du récepteur spécifique au complexe Cbl-FI et une diminution de l'affinité pour ce complexe (Guéant et al, 1999). Le traitement repose sur l'administration par injection intramusculaire de 1 mg de l'HOCbl ou de CNCbl d'une façon journalière jusqu'au rétablissement complet des réserves en vitamine B12 (Watkins et Rosenblatt, 2011).

C. Déficience en transcobalamine :

La transcobalamine est une protéine (43 kDa) codée par le gène *TCN2* qui est situé sur le bras long du chromosome 22 (Regec et al, 1995). La déficience en transcobalamine est une maladie autosomique récessive sévère qui débute généralement dans les deux premiers mois de la vie, accompagnée d'un retard de croissance, de vomissements et d'une anémie mégalo-blastique (Tableau 4) (Cooper et Rosenblatt, 1987). 48 personnes affectées ont été décrites dans la littérature médicale (Namour et al, 2003 ; Trakadis et al, 2014 ; Ünal et al, 2015 et Bartakke et al, 2015). En cas d'absence de traitement, les symptômes de ce trouble s'aggravent en provoquant des problèmes neurologiques et une déficience des fonctions immuno-hématologiques. Puisque seulement 20% de la cobalamine circulante est liée à la transcobalamine (Seligman et al, 1980), les patients souffrant de cette pathologie ne montrent pas une diminution remarquable du niveau de cobalamine sérique (Trakadis et al, 2014). Plus de 20 mutations du gène *TCN2* causant la déficience en TC ont été identifiées. Ces mutations ont comme conséquence une réduction de la synthèse de la TC ou une perturbation de la capacité de la TC mutée de se lier à la cobalamine. Le traitement recommandé repose sur l'administration intramusculaire ou orale de CNCbl ou de l'OHCbl. Le but de traitement est de maintenir la concentration sérique de cobalamine très élevée (1000-10000 pg/ml) (Watkins et al, 2009).

D. Déficience en récepteur de la transcobalamine (CD320) :

Le récepteur de la TC est une glycoprotéine formée de 282 acides aminés et codée par le gène *CD320* (Quadros et al, 2009). Il est composé d'un domaine extracellulaire de 199 acides aminés contenant deux domaines de deux récepteurs de LDL-classe A, un domaine transmembranaire de 21 aa et un domaine cytoplasmique de 32 aa (Quadros et al, 2013). Ce gène est situé sur le chromosome 19p13.2. Des délétions dans le gène *CD320* ont été identifiées chez cinq patients ayant une capacité réduite de fixer le complexe Cbl/TCII. Le test de dépistage néonatal de ces cinq patients a montré la présence d'une acidurie méthylmalonique associée avec un taux d'homocystéinémie normal ou élevé. A noter que ce désordre n'a pas un phénotype clinique clair (Quadros et al, 2010).

E. Déficience en haptocorrine :

L'haptocorrine, aussi connue sous le nom de transcobalamine 1 (TCI) est une protéine formée de 433 acides aminés et qui, chez l'homme, est codée par le gène *TCN1* situé sur le chromosome 11 (Shows et al, 1996). Il s'agit d'une glycoprotéine produite par les glandes salivaires dont son rôle et sa fonction physiologique ne sont pas totalement élucidés (Carmel et al, 2009). La déficience en haptocorrine ne produit pas de séquelles définitives autres que de faibles niveaux sériques de cobalamine indiscernables de ceux d'une véritable carence en cobalamine (Carmel, 2003). Deux mutations c.270delG et c.315C>T ont été identifiées (Carmel et al, 2009). A noter que la déficience en haptocorrine ne provoque pas des manifestations cliniques chez les patients. Ceci tend à confirmer l'hypothèse que le niveau normal du complexe TC-Cbl est suffisant pour l'absorption de la totalité de la cobalamine par les cellules intestinales (Watkins et al, 2011).

II. Classification des défauts génétiques affectant le métabolisme intracellulaire de la vitamine B12 par le test de complémentation :

Les tests enzymatiques ou d'incorporation d'éléments radio-marqués nécessaires au diagnostic des défauts génétiques du métabolisme intracellulaire de la cobalamine sont réalisés avec des fibroblastes de patients. Pour identifier ces défauts, le test de complémentation est utilisé. On dira qu'il y a complémentation si la confrontation conduit au rétablissement du phénotype sauvage et non complémentation dans le cas contraire. Si les fibroblastes provenant de deux patients différents sont capables de se compléter et de se corriger mutuellement, alors les patients appartiennent à deux groupes de complémentation différents. Jusqu'à présent, dix groupes de complémentation ont été identifiés : cblE, cblG, cblA, cblB, cblF, cblJ, cblC, cblD, cblX et mut (Froese et al. 2010 ; Watkins et al, 2016) (Figure 15). Chacun de ces troubles est hérité de façon autosomique récessive. En fonction de l'étape métabolique atteinte, les défauts génétiques du métabolisme cellulaire de la cobalamine peuvent altérer la synthèse ou l'utilisation d'AdoCbl, de MeCbl, ou des deux. En règle générale, les troubles qui affectent la synthèse d'AdoCbl ou qui affectent directement la méthylmalonylCoA mutase, entraînent une acidémie et une acidurie méthylmalonique isolée. Les troubles affectant la synthèse de MeCbl, entraînent une hyperhomocystéinémie et une homocystinurie. Alors que les troubles, qui affectent à la fois les 2 coenzymes, entraînent une acidurie méthylmalonique combinée à une homocystinurie (Watkins et Rosenblatt 2011).

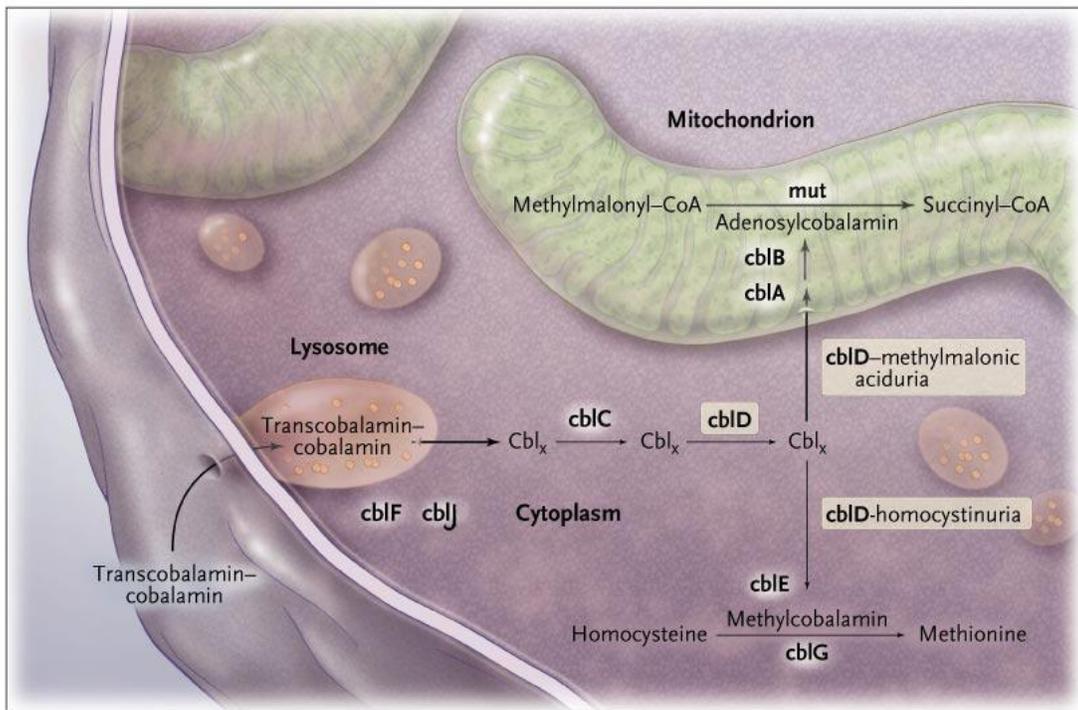


Figure 15 : Défauts du métabolisme de la cobalamine (d'après Coelho et al, 2008).

À ce jour, dix défauts du métabolisme de la vitamine B12 ont été identifiés. La cobalamine liée à la transcobalamine pénètre dans la cellule par endocytose. Le transport de la cobalamine libérée du lysosome dans le cytoplasme est défectueux chez les patients atteints des défauts *cblF* et *cblJ* (Kim et al, 2012b). Les étapes dans le cytosol après la libération lysosomale de la cobalamine sont encore mal connues (*cblC* et *cblD*). Dans le cytoplasme, l'homocystéine est convertie en méthionine grâce à la méthionine synthase qui utilise comme cofacteur, la méthylcobalamine (*cblE*, *cblG*). Après son transport dans la mitochondrie, la cobalamine est transformée en adénosylcobalamine, cofacteur pour la méthylmalonyl-CoA mutase (*mut*), par la cobalamine adénosyl-transférase (*CblB*). Le rôle exact de la protéine associée au groupe *CblA* n'est pas clair. La protéine *CblD* constitue un point de branchement entre la voie cytosolique et mitochondriale. A noter que le *cblX* qui n'est pas présent sur la figure, est un défaut qui conduit à une diminution de l'expression de *MMACHC*, et est donc semblable au *cblC*.

Défauts génétiques	Présentation clinique	
	Première année de vie	Période d'enfance et d'adolescence
Déficience du facteur intrinsèque	Anémie mégaloblastique, retard de croissance, vomissements, anémie, diarrhée, constipation, anorexie, irritabilité.	Cas rapportés dont les manifestations cliniques avant l'âge de 5 ans
Déficience en TC	Anémie mégaloblastique, léthargie, vomissements/ diarrhée, faiblesse, infections graves, absence d'anomalies neurologiques	Cas rares de présentation tardive rapportés
cbIC/cbID/cbIF	Détérioration neurologique aiguë, maladie multi-systémique, rétinopathie (cbIC), anémie mégaloblastique, pancytopenie	Confusion, ataxie, symptômes extrapyramidaux
cbIG/cbIE	Léthargie, vomissements, retard mental, cécité, ataxie, atrophie cérébrale, anémie mégaloblastique, myélinisation retardée	Cas rares de présentation tardive rapportés
cbIA/cbIB, mut	Crises d'acidose, léthargie, hypotonie, vomissements, encéphalopathie, retard mental, aplasie médullaire	Cas rares de présentation tardive rapportés
cbIJ	Hypotonie, léthargie, suppression de la moelle osseuse, difficultés d'alimentation, anémie microcytaire, défauts cardiovasculaires	Pas de cas rapportés après 1 an
cbIX	Retard sévère du développement, choréoathétose et épilepsie réfractaire	Pas de cas rapportés après 1 an

Tableau 4. Présentation clinique des défauts génétiques du transport, de l'absorption et du métabolisme de la vitamine B12

II.1 Défauts génétiques affectant selectivement de la reméthylation de l'homocystéine en méthionine :

A. Les groupes de complémentation cblG et cblE :

i. Etiologie/Pathophysiologie :

Le phénotype de cblG et de cblE est hérité selon le mode autosomique récessif (Watkins et Rosenblatt, 1989) (Figure 16). La majorité des patients souffrant des défauts cblG et de cblE sont symptomatiques pendant leur première année de vie ou leur enfance (Zavadakova et al, 2005) alors que d'autres cas ne seront détectés qu'à l'âge adulte (Rosenblatt et Fenton, 2001). La prévalence de ces deux défauts intracellulaires du métabolisme de la cobalamine est rare et à ce jour, 30 patients de cblE et 38 cas de cblG ont été rapportés. Ces deux groupes de complémentation possèdent un défaut de synthèse de la méthionine dû à une diminution de l'activité de la méthionine synthase. L'activité de la méthionine synthase constitue un élément de différenciation entre les patients cblE et cblG. Chez les fibroblastes cblE, l'activité enzymatique de la méthionine synthase est corrigée en présence d'agents réducteurs. Ceci n'est pas le cas dans les fibroblastes cblG où l'activité MS reste basse même dans des conditions réductrices (Watkins et Rosenblatt, 1989 et Sillaots et al, 1992). Parmi les patients cblG, un certain nombre présente une activité de la MS indétectable et la dénomination en cblG variant (CblG*) a été utilisée (Sillaots et al, 1992 ; Wilson et al, 1998).

ii. Présentation clinique :

Le tableau clinique des deux défauts génétiques de cblG et de cblE est indiscernable (Tableau 4). Les symptômes les plus fréquemment rapportés chez les patients souffrant des défauts cblG ou de cblE sont l'anémie mégaloblastique ou macrocytaire ou macrocytose (Huemer et al, 2015), une variété de dysfonctionnements neurologiques, y compris un retard de développement, un retard de croissance, une atrophie cérébrale, une myélinisation retardée (détectée par imagerie du système nerveux central) et des

anomalies électro-encéphalographiques (Müller et al 2007 ; Outteryck et al, 2012 ; Richard et al, 2013) et des problèmes ophtalmologiques comme la nystagmus et une acuité visuelle altérée (Zavadakova et al 2002 ; Outteryck et al, 2012 ; Poloschek et al, 2005). Parmi les autres symptômes les moins souvent reportés, on note une hypertension pulmonaire (Labrune et al 1999), une leucopénie ou une pancytopénie (Palanca et al 2013 ; Schuh et al 1984), des infections récurrentes (Harding et al, 1997), une microcéphalie (Fowler et al 1997), une hydrocéphalie (Müller et al 2007 ; Palanca et al 2013; Zavadakova et al 2005 ; Outteryck et al 2012), une hypotonie ou une hypertonie, une léthargie, des vomissements, et une ataxie (Watkins et Rosenblatt, 1989).

iii. Causes génétiques des défauts cblG et de cblE :

Il a été démontré que le gène responsable du défaut cblG est le gène *MTR* codant pour la méthionine synthase (Gulati et al, 1996 ; Leclerc et al, 1996). Plus de 20 mutations (faux-sens, non-sens, 'frameshift' ou décalage du cadre de lecture) du gène *MTR* ont été identifiées chez les patients cblG. Un grand nombre de ces mutations (c.12-13delGC, c.381delA, c.2101delT, c.2669-2670delTG, et p.Glu1205Ter) conduisent à la production d'une version protéique tronquée de certains domaines critiques pour sa fonction enzymatique.

Le défaut cblE résulte de mutations dans le gène *MTRR* qui code pour la méthionine synthase réductase. A ce jour, 19 mutations du gène *MTRR* ont été identifiées (Ruiz-Mercado et al, 2016) dont la plus commune (25%) est la mutation intronique c.903+469 T>C (Homolova et al, 2010).

iv. Diagnostic :

Le diagnostic des défauts cblG et cblE repose sur la mise en évidence d'un taux élevé d'homocystéine et d'homocystine dans le plasma sanguin, d'une hypométhioninémie et d'une homocystinurie sans acidurie méthylmalonique. Les fibroblastes cblG et cblE ont un taux réduit de synthèse intracellulaire de MeCbl après incorporation de cyanocobalamine marquée au cobalt-57 alors que chez les cellules cblG-variant, l'activité

de la méthionine synthase mesurée par l'incorporation de folate radio marque est souvent indétectable. Les concentrations sériques en folates et en cobalamine sont normales. Le diagnostic prénatal est possible par l'identification de taux élevés d'homocystéine dans le liquide amniotique ou par la mesure du taux de MeCbl des cellules d'amniocytes en culture. Le test de complémentation génétique permet la distinction des patients de cblG des patients de cblE.

v. Traitement :

Après le diagnostic de cblG et de cblE, l'administration d'hydroxocobalamine (OHCbl) doit se faire systématiquement par voie intramusculaire pour court-circuiter la voie d'absorption intestinale défectueuse chez ces patients (Watkins et Rosenblatt et al, 2011). L'injection de 1 mg d'OHCbl est effectuée d'une façon quotidienne jusqu'à la normalisation des taux de cobalamines plasmatiques. Grâce à ce traitement, l'amélioration des paramètres biochimiques, hématologiques et de la plupart des symptômes cliniques est rapide (Rosenblatt et Fowler, 2006). Cependant, les anomalies neurologiques réagissent plus lentement au traitement avec des défauts résiduels. Dans certains cas, une supplémentation en bêtaïne et en L-méthionine est inclus dans le traitement (Watkins et Rosenblatt, 2011).

B. Autres causes d'homocystinurie :

Le déficit enzymatique en MTHFR affecte le métabolisme intracellulaire de l'acide folique en empêchant la réduction du 5-10-méthylène-tétra-hydrofolate en 5-méthyl-tétra-hydrofolate. Ce déficit entraîne une carence en méthyl-tétra-hydrofolate et par conséquent une homocystinurie avec hypométhioninémie. Ce déficit de MTHFR se transmet par le mode autosomique récessif. Il est dû à des mutations au niveau du gène *MTHFR* situé sur le chromosome 1p36.3. Environ 100 mutations dans plus de 170 patients ont été identifiées (Thomas et al, 2005 ; Watkins et Rosenblatt, 2014 ; Froese et al, 2016). Dans la majorité des cas, cette déficience génétique conduit dans la première année de vie à des convulsions, des apnées récurrentes, et une microcéphalie (Diekman et

al, 2014). Dans certains cas, cette maladie se déclenche à l'adolescence ou à l'âge adulte par des troubles psychiatriques (schizophrénie), des anomalies motrices et une ataxie (Lossos et al, 2014 ; Huemer et al, 2016). L'activité enzymatique résiduelle chez les patients présentant une forme précoce est significativement plus faible (3,4% du contrôle) que les patients d'apparition tardive (14,5% du contrôle) (Froese et al, 2016). Le traitement du déficit sévère repose sur l'administration précoces de fortes doses de bétaine (20–150 mg/kg/jour) pour prévenir les anomalies cognitives (Diekman et al, 2014), associées à une supplémentation en méthionine, en pyridoxine et en cobalamine. L'acide folique doit être évité car il peut aggraver le déficit en méthylTHF dans le SNC (Hyland et al, 2010).

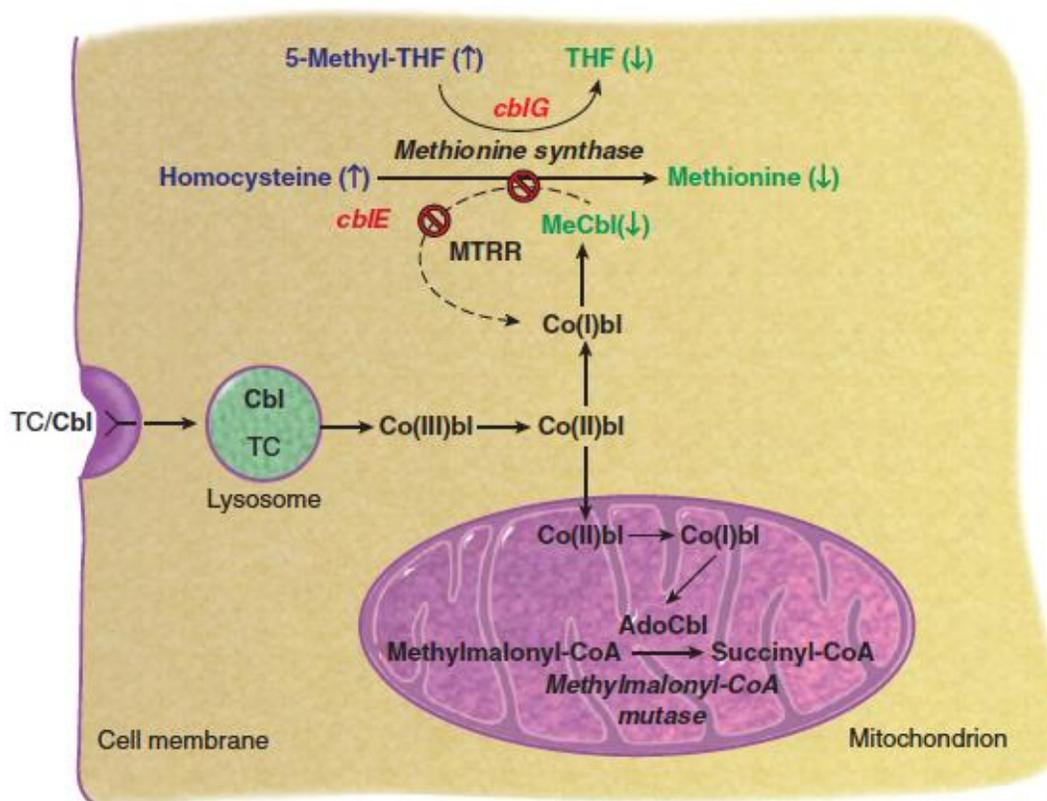


Figure 16 : Résumé des défauts cblG et cblE et leurs conséquences biochimiques

II.2 Défauts génétiques affectant sélectivement la conversion de l'acide méthylmalonique en succinyl-coenzyme A :

A. Groupes de complémentation cblA, cblB et mut :

i. Etiologie/Pathophysiologie :

Les trois défauts cblA, cblB et mut se transmettent par le mode autosomique récessif (Morell et Rosenblatt, 2010) (Figure 17). A ce jour, plus de 100 patients cblA, plus de 60 cas cblB et plus de 450 patients mut ont été rapportés dans le monde. Les fibroblastes de patients cblA se caractérisent généralement par une incapacité à convertir l'HO-[57Co] Cbl en Ado-[57Co] Cbl, alors que la synthèse de MeCbl reste normale (Dobson et al, 2002). En revanche, ces cellules sont capables de synthétiser l'AdoCbl en présence de HO-Cbl et d'agents réducteurs chimiques tels que le dithiothréitol (DTT) et d'ATP (Watkins et al, 2000). Le défaut cblB a été séparé biochimiquement de cblA par l'absence de synthèse d'AdoCbl même en présence d'un système réducteur. Les défauts génétiques cblA et cblB provoquent aussi une réduction de l'activité enzymatique de la méthylmalonyl CoA-mutase dépendante de l'AdoCbl.

Le défaut génétique mut a été subdivisé en deux catégories : le premier est mut⁻ qui présente une activité enzymatique résiduelle ou partielle (0.5-50%) de la méthylmalonyl-CoA mutase mitochondriale et le deuxième type est mut⁰ qui a une activité enzymatique indétectable (Willard et al, 1980).

ii. Présentation Clinique :

La plupart des patients cblA, cblB et mut présentent une crise d'acidose durant la période néonatale ou pendant leur première année de vie (Tableau 4). La maladie se manifeste généralement par des vomissements, une déshydratation, une tachypnée, une léthargie, un retard de croissance et de développement, une hypotonie, et une encéphalopathie (Watkins et al, 2011). Lorsque le taux d'acide méthylmalonique atteint des niveaux toxiques, des anomalies de la moelle osseuse telles que l'anémie, la leucopénie, la

thrombocytopénie peuvent se produire. L'acidémie méthylmalonique conduit souvent à une insuffisance rénale chronique pendant l'adolescence ou pendant l'âge adulte (Rosenblatt et Fowler, 2006). Les patients cblB et Mut⁰ sont plus sévèrement atteints que les patients cblA et Mut⁻ avec des complications neurologiques et métaboliques plus graves (Horster et al, 2007).

iii. Causes génétiques des défauts cblA, cblB et mut :

Le gène responsable du défaut cblA a été découvert par Dobson et al. en 2002 et a été nommé *MMAA* (methylmalonic aciduria type A). Ce gène est situé sur le chromosome 4q31.1-2 et code pour la protéine MMAA (39 kDa) de la famille G3E des protéines de liaison au GTP (Ledley et al, 1988). La protéine MMAA joue un rôle important dans le transfert d'AdoCbl de la cobalamine adénosyltransférase vers la méthylmalonyl CoA-mutase et est obligatoire pour la stabilisation de la mutase liée à l'AdoCbl (Watkins et al, 2011). La mutation la plus commune est la c.433C>T et qui touche presque 43% des patients de l'Amérique du Nord (Merinero et al, 2008) alors que la mutation la plus dominante au Japon est c.503delC (Yang et al, 2004).

Le défaut génétique cblB est le résultat des mutations dans le gène *MMAB* localisé sur le chromosome 12q24 et qui code pour la protéine cob(I)alamine adénosyltransférase (MMAB ou ATR) de poids moléculaire de 37.4 kDa (Padovani et al, 2008). La protéine MMAB partage une homologie avec l'adénosyltransférase bactérienne pDuO. Elle catalyse la dernière étape mitochondriale de la synthèse d'AdoCbl. De plus, la majorité des mutations qui ont été identifiées, sont localisées sur le site actif de MMAB (Saridakis et al, 2004 ; Schubert et Hill, 2006 ; St.Maurice et al, 2007).

Le défaut génétique mut résulte de mutations du gène *MUT* situé sur le chromosome 6p21 et codant pour l'enzyme méthylmalonyl-CoA mutase. Plus de 200 mutations de ce gène ont été identifiées (Merinero et al, 2008). Les mutations les plus fréquentes se situent sur les exons 2, 3, 6 et 11 du chromosome 6 (Worgon et al, 2006). Plusieurs mutations sont fréquentes dans certains groupes ethniques, y compris c.2150G> T (p.G717V) chez les patients d'origine africaine, c.349G> T (p.E117X) chez des patients japonais, et c.323C> T (p.R108C) chez les patients hispaniques américains (Ogasawara et

al, 1994 ; Adjalla et al, 1998 ; Worgan et al, 2006).

iv. Diagnostic :

Les manifestations biochimiques des patients *cblA* et *cblB* se résument à une accumulation d'acide méthylmalonique et d'acide propionique et ces métabolites, tels que la propionylcarnitine et le 3-hydroxypropionique, dans les urines et le plasma. Chez ces patients, l'excrétion urinaire de ces composés organiques est assurée suite à leur conjugaison avec la carnitine sous forme d'acylcarnitines (surtout propionylcarnitine) (Chalmers et al, 1984 ; Roe et al, 1984 ; Zwickler et al, 2007 ; Guven et al, 2012). Ceci provoque une déplétion en réserves de carnitine. Les défauts génétiques *cblA* et *cblB* sont différenciés l'un de l'autre par des tests de complémentation et par séquençage génétique.

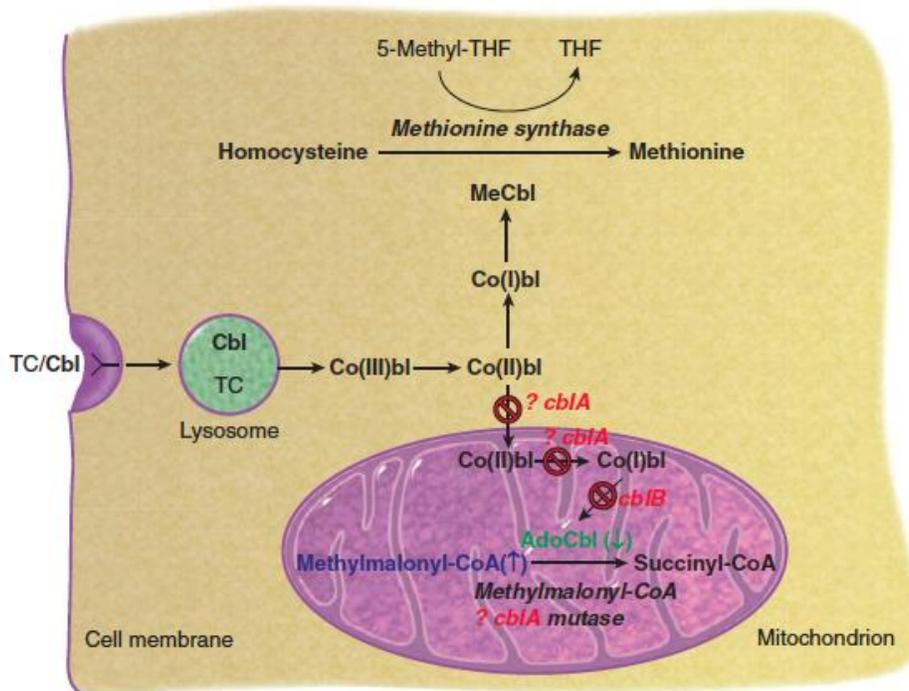


Figure 17 : Résumé des défauts *cblA*, *cblB* et leurs conséquences biochimiques

v. Traitement des patients cblA, cblB et mut :

Le traitement des patients cblA et cblB nécessite une administration journalière d'HOCbl par voie orale ou par injection intramusculaire une à deux fois par semaine. De plus, les patients doivent suivre un régime alimentaire hypo-protidique ou bien utiliser des formules diététiques pauvres en valine, isoleucine, méthionine et en thréonine, afin de limiter le taux d'acides aminés qui consistent une source importante de méthylmalonyl-CoA. La supplémentation en carnitine est essentielle pour compenser les pertes urinaires en cette substance (Rosenblatt et Fowler, 2006). Des antibiotiques oraux peuvent être utiles pour réduire l'acide propionique de la flore intestinale. La majorité des patients cblA (90%) répondent au traitement avec un bon pronostic, alors que seulement 40% des patients cblB répondent au traitement avec un moins bon pronostic. Selon Horster et al en 2007 et Matsui et al, en 1983, les patients mut⁰ sont plus gravement touchées et plus susceptibles de mourir précocement que les patients cblB, qui sont à leur tour plus sévèrement touchés que les patients cblA et mut⁻ (Watkins et Rosenblatt, 2011).

II.3 Défauts génétiques affectant à la fois la synthèse de la méthylcobalamine et de l'adénosycobalamine

A. Le groupe de complémentation cblF :

i. Etiologie/Pathophysiologie :

Le groupe de complémentation cblF est un trouble très rare du métabolisme de la vitamine B12 (Figure 18). Il a été décrit chez seulement 13 patients (Rutsch et al, 2009 ; Rutsch et al, 2010). Ce trouble est caractérisé par une incapacité à transférer la cobalamine libérée dans les lysosomes vers le cytoplasme. Les cellules des patients cblF accumulent une large quantité de Cbl dans les lysosomes et n'est donc pas disponible pour sa conversion en AdoCbl ou MeCbl. Ceci entraîne la diminution significative de l'activité de la méthionine synthase et de celle de la méthylmalonylCoA mutase. De plus, la transcytose iléale de la cobalamine chez ces patients est affectée ce qui empêche l'absorption de la cobalamine par voie orale (Rosenblatt et al, 2009).

ii. Présentation clinique :

Les symptômes cliniques se manifestent dans la première année de vie des patients (Tableau 4). La présentation clinique est très variable. Elle peut inclure une stomatite, une glossite, une hypotonie, des anomalies hématologiques (une anémie, une macrocytose, une pancytopénie, une neutropénie ou une thrombocytopénie), des infections récurrentes, un retard développement, une léthargie, une pneumonie, une hépatomégalie, et une encéphalopathie. Des anomalies faciales mineures ont été décrites chez deux patients et des anomalies cardiaques congénitales dans quatre autres cas (Rutsch et al, 2009 ; Armour et al, 2013).

iii. Causes génétiques du défaut cblF :

Ce défaut est le résultat de mutations dans le gène *LMBRDI* présent sur le chromosome 6q13 qui code pour la protéine lysosomale membranaire LMBD1. Cette protéine, qui contient 9 domaines transmembranaires, partage une certaine homologie avec une famille de protéines membranaires comprenant le récepteur LIMR qui internalise les lipocalines, récepteurs de petites molécules hydrophobique tels que les stéroïdes et les lipides (Rutsch et al, 2009). Jusqu'à présent, six mutations du gène *LMBRDI* ont été identifiées.

iv. Diagnostic :

Puisque la cobalamine ne peut pas être libérée du compartiment lysosomal, le taux intracellulaire d'AdoCbl et de MeCbl est faible. Les fibroblastes des patients cblF ont une hyperhomocystinémie, une homocystinurie, un taux normal ou faible de méthionine, une acidurie méthylmalonique, une acidémie méthylmalonique, un taux élevé ou normal de cystathionine à cause de l'augmentation du taux d'homocystéine, un taux faible ou normal de Cbl sérique et la présence d'une anémie mégaloblastique.

B. Le groupe de complémentation cblJ :

i. Etiologie/Pathophysiologie :

La transmission de ce désordre se fait par le mode autosomique récessif. Il a été rapporté dans quatre patients (Watkins et Rosenblatt, 2016).

ii. Présentation clinique :

Le premier sujet d'origine américaine présentait une anomalie dans le dépistage néonatal, avec une hypotonie, une léthargie, et une suppression de la moelle osseuse. Le deuxième patient était un nouveau-né européen qui présentait des difficultés d'alimentation, une anémie microcytaire et des défauts cardiovasculaires congénitaux (Coelho et al, 2012). Les deux autres cas proviennent de Taiwan (Kim et al, 2012 ; Takeichi et al, 2015). Le premier patient souffrait de vertiges et de céphalées occasionnelles à l'âge de 2-3 ans et d'une hyperpigmentation de la peau et des cheveux gris à l'âge de 4 ans (Kim et al, 2012). Le deuxième sujet était une fille qui a présenté à l'âge de 6 ans une hyperpigmentation avec des cheveux marrons foncé (au lieu de noir) sans symptômes neurologiques ni cardiovasculaires (Takeichi et al, 2015). Les résultats des études faites sur les fibroblastes des deux patients ont été similaires à ceux obtenus avec les fibroblastes cblF avec une diminution de la capacité de transport de la cbl de la membrane lysosomale vers le cytoplasme d'où son accumulation au niveau des lysosomes (Watkins et Rosenblatt, 2016). Ceci provoque alors une diminution de l'activité de la méthionine synthase et de la méthylmalonyl-CoA mutase. Concernant les fibroblastes du patient taiwanais, une réduction moyenne de la synthèse de MeCbl et d'AdoCbl a été documentée (Watkins et Rosenblatt, 2016) (Figure 18).

iii. Causes génétiques du défaut cblJ :

Le défaut cblJ est le résultat de mutations sur le gène *ABCD4* situé sur le chromosome 14q24.3. Ce gène code pour la protéine ABCD4, de taille 68.6 kDa, membre de la famille D des transporteurs ATP binding cassette (ABC) (Coelho et al, 2012). Cinq mutations du gène *ABCD4* ont été rapportées : trois mutations faux-sens (c.956A>G, c.423C>G, et c.1456G>T), une mutation d'insertion (c.1746_1747insCT, p.Glu583Leufs*9), et une mutation qui modifie l'épissage c.542+1G>T.

iv. Diagnostic :

Au niveau biochimique, les quatre patients cblJ avaient des taux élevés d'homocystéine dans le sang, un taux faible de cobalamine sérique, une anémie macrocytique, une hypométhioninémie et un taux élevé d'acide méthylmalonique dans les urines.

C. Le groupe de complémentation cblC :

i. Etiologie/Pathophysiologie :

Le défaut cblC est le groupe de complémentation affectant le métabolisme de la cobalamine le plus courant puisqu'il touche 550 patients dans le monde (Lerner-Ellis et al, 2009 ; Nogueira et al, 2008 ; Liu et al, 2010 ; Atkinson et al, 2014) (Figure 18). La diminution de la capacité de réduction de la cobalamine cytoplasmique chez les fibroblastes des patients cblC a pour conséquence une altération de la synthèse des deux coenzymes AdoCbl et MetCbl ainsi que de l'activité des enzymes qui dépendent de la cobalamine. En 2005, Lerner-Ellis et al. ont identifié le gène responsable de ce défaut et l'ont nommé *MMACHC* (méthylmalonique acidurie de type CblC avec homocystinurie).

ii. Présentation clinique :

Le tableau clinique du défaut cblC est très hétérogène. En se reposant sur l'âge d'apparition des symptômes cliniques, ce défaut peut être classifié sous deux sous-groupes. Les patients ayant un déclenchement précoce (early-onset) de la maladie présentent des manifestations cliniques sévères dans leur première année de vie : un retard de croissance staturo-pondérale, un retard de développement, une hypotonie, une léthargie, une microcéphalie, une hydrocéphalie des convulsions, une anémie macrocytaire, des épilepsies, un syndrome hémolytique et urémique (SHU) et des anomalies ophtalmologiques. La forme tardive (late-onset) est moins fréquente et présente un tableau clinique plus bénin, caractérisé par des signes cliniques moins sévères après l'âge de quatre ans selon Rosenblatt (Rosenblatt et al, en 1997) et après l'âge d'un

an selon Fischer (Fischer et al, 2013). Les patients ayant cette forme présentent des symptômes d'ataxie, de démence ou de psychose, une myélopathie et des troubles psychiatriques. Ces patients ont une meilleure survie et répondent mieux au traitement, avec moins de séquelles neurologiques par rapport aux patients ayant une forme précoce, et une absence de microcéphalie et de cardiomyopathie (Rosenblatt et al, 1997 ; Kilic et al, 2013 ; Fischer et al, 2014).

iii. Causes génétiques du défaut cblC :

Environ 70 mutations du gène *MMACHC* ont été identifiées chez les patients cblC (Watkins et Rosenblatt, 2011). La mutation c.271dupA est la plus commune et elle est retrouvée dans environ la moitié des allèles pathogéniques (Lerner-Ellis et al, 2009). Des études ont suggéré l'existence d'une corrélation entre les génotypes et les phénotypes. Les mutations c.271dupA et c.331C>T ont été associées à un développement précoce de la maladie, alors que la mutation c.394C>T a été associée à une apparition plus tardive (Lerner-Ellis et al, 2006).

iv. Diagnostic :

La diminution de l'activité de la méthionine synthase chez les patients cblC, induit un taux faible de méthionine. Ces patients souffrent aussi d'une acidémie et d'une acidurie méthylmalonique. L'accumulation de l'acide méthylmalonique (MMA), préférentiellement stocké dans le système nerveux central de ces patients, contribue à un dysfonctionnement neurologique et à des dommages cellulaires menant finalement à une excitotoxicité (un type de mort des cellules causé par un excès de signalisation glutamatergique) (Kölker et al, 2008). L'acide méthylmalonique peut aussi agir comme une substance néphrotoxique, en altérant les processus de transport dans le tubule proximal et en causant une protéinurie, et un traumatisme rénal tubulaire (Sauer et al, 2009). De plus, ces patients ont une hyperhomocystinémie sévère et une homocystinurie provoquant ainsi des dommages vasculaires en induisant un stress oxydatif élevé, une stimulation des voies pro-inflammatoires et de la peroxydation lipidique (Weiss, 2005 ;

Papatheodorou et Weiss, 2007).

D. Le groupe de complémentation cblD :

i. Etiologie/Pathophysiologie :

Le défaut génétique cblD est très rare. Les deux premiers cas diagnostiqués en 1970 avec un trouble de cblD étaient deux frères ayant une homocystinurie et une acidurie méthylmalonique. Le premier patient était un garçon symptomatique âgé de 14 ans ayant un frère asymptomatique âgé de 2 ans. Les symptômes présentés par le premier cas étaient un léger retard mental, une sévère pathologie comportementale et un trouble neuromusculaire (Goodman et al, 1970). A ce jour, 18 patients souffrant du défaut cblD ont été reportés. L'hétérogénéité qui existe au sein du phénotype clinique de ces patients a donné lieu à la classification de ce défaut en trois phénotypes biochimiques différents (Suormala et al, 2004) (Figure 18). Six patients ont la forme classique (cblD-MMA/HC) qui se caractérise par une acidurie méthylmalonique combinée à une homocystinurie due à une diminution de la synthèse des deux cofacteurs enzymatiques, l'AdoCbl et la MeCbl. De plus, six cas ont la forme cblD-HC qui provoque une homocystinurie isolée suite à un déficit de MeCbl et six autres patients présentent une déficience en AdoCbl entraînant la forme cblD-MMA avec une acidurie méthylmalonique isolée (Stucki et al, 2012 ; Parini et al, 2013).

ii. Présentation clinique :

Les manifestations cliniques varient considérablement entre les patients cblD. Les patients appartenant au groupe de cblD-HC présentent un retard de développement, une ataxie et une anémie mégaloblastique. Les patients appartenant au groupe cblD-MMA présentent habituellement une détresse respiratoire, une décompensation métabolique, une hypotonie musculaire, un retard de croissance, une hémorragie crânienne, et un électroencéphalogramme anormal sans aucun signe d'anémie mégaloblastique. Les patients cblD-MMA/HC souffrent d'un retard de développement, une hypotonie, une

léthargie et une anémie mégaloblastique (Coelho et al, 2008).

iii. Causes génétiques du défaut CblD :

Il a été prouvé que le gène *MMADHC* provoque le défaut génétique cblD du métabolisme de la vitamine B12 (Coelho et al, 2008). La localisation et la nature des mutations du gène *MMADHC* déterminent le phénotype biochimique. Les patients cblD-MMA sont porteurs d'une mutation qui entraîne un arrêt prématuré de la traduction au niveau de la partie N-terminale de la protéine MMADHC et une ré-initiation de la traduction au niveau de la deuxième ou de la troisième méthionine située en position 62 et 116. De plus, les mutations faux-sens provoquant des substitutions d'acides aminés dans la partie C-terminale de MMADHC conduisent à un défaut dans la voie de synthèse de MeCbl en empêchant sa liaison avec la protéine MMACHC alors que les patients cblD-MMA/HC portent des mutations faux-sens délétères en aval de la position Met 116 (Jusufi et al, 2014).

iv. Diagnostic :

Grâce au progrès dans la compréhension de la base moléculaire du défaut cblD et le rôle causal du gène *MMADHC*, le diagnostic clinique, biochimique et moléculaire de cette maladie est amélioré. Le défaut cblD peut être diagnostiqué tôt dans la vie par le dépistage néonatal (Atkinson et al, 2014).

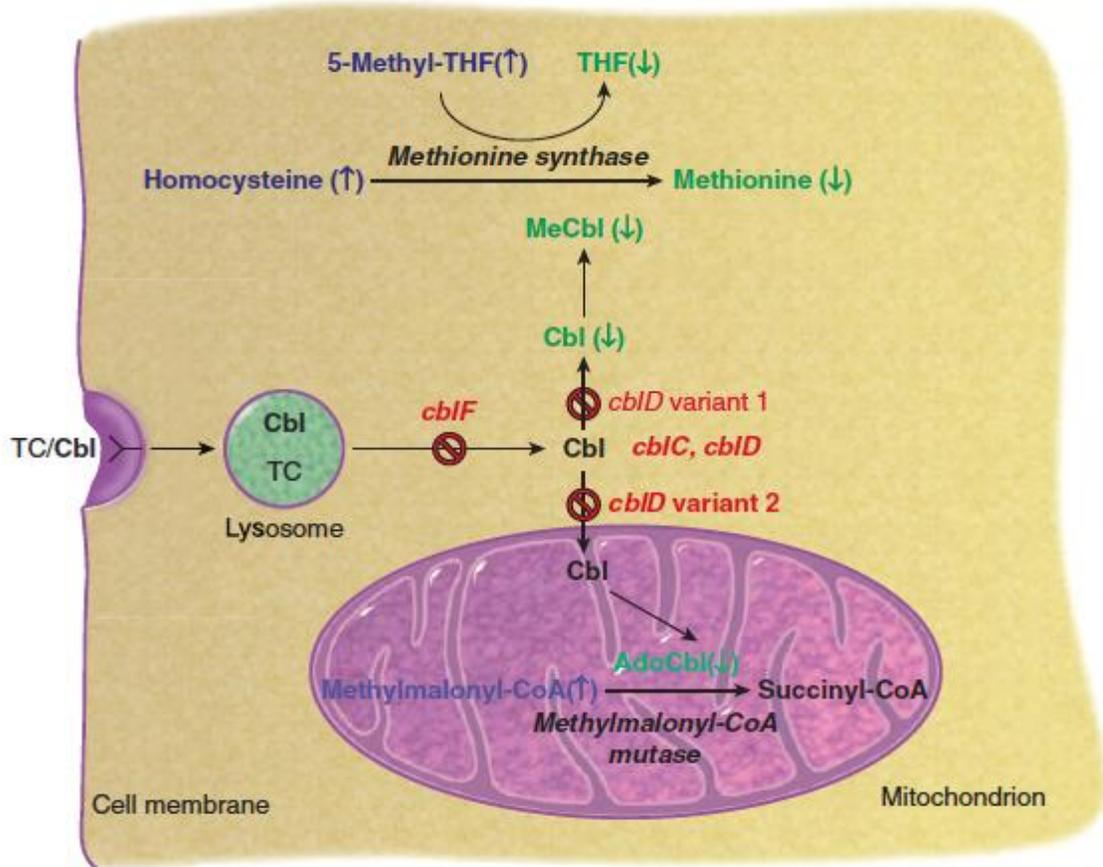


Figure 18 : Résumé des défauts *cbIF*, *cbIC* et *cbID* et leurs conséquences biochimiques

E. Le traitement des défauts *cbIC*, *cbIF*, *cbID*, et *cbIJ* :

Le traitement de ces défauts génétiques est effectué par l'administration intramusculaire d'hydroxocobalamine qui est plus efficace que celle de CNCbl (Mellman et al, 1979 ; Andersson et Shapira, 1998) dans des doses qui varient de 1 à 20 mg par jour selon le cas, pour normaliser les concentrations de MMA et de Hcy (Carrillo-Carrasco et al, 2009 ; Fischer et al, 2014 ; Suormala et al, 2004 ; Rosenblat et Fowler, 2006). Dans certains cas, l'administration de l'acide folique est nécessaire avec l'objectif d'optimiser les activités enzymatiques du métabolisme de la méthionine, dans la mesure où les enzymes impliquées tels que la méthionine synthase et la méthylène tétrahydrofolate réductase ont besoin de cette vitamine pour agir efficacement. Chez les patients *cbID*, ce traitement

assure une amélioration globale des anomalies neurologiques et une normalisation des troubles biochimiques et hématologiques. Alors que chez les patients cblC, les séquelles neurologiques persistent chez la majorité de ces patients (Watkins et Rosenblatt, 2011) d'où l'importance du diagnostic et de l'intervention précoce pour prévenir des manifestations neurologiques irréversibles.

F. Le groupe de complémentation cblX :

Une analyse récente de 18 patients cblC (diagnostiqués selon le test de complémentation génétique) n'ayant aucune mutation détectée dans le gène *MMACHC* a conduit à l'identification d'un nouveau défaut génétique de la vitamine B12 appelé cblX (Yu et al, 2013). Le séquençage de l'exome de ces patients de sexe masculin a permis l'identification de différentes mutations faux-sens dans le gène *HCFC1*, situé sur le chromosome X (Gérard et al, 2015). Ce gène code pour la protéine HCFC1, qui joue un rôle de co-régulateur de la transcription de plusieurs gènes dont le gène *MMACHC* (Yu et al, 2013) et qui interagit avec plusieurs protéines pour réguler différents processus biologiques, tels que la prolifération cellulaire, la migration et la mort cellulaire (Luciano et Wilson, 2003 ; Machida et al, 2009 ; Yu et al, 2010). Cette maladie se manifeste dans les premiers mois de la vie avec une présentation clinique similaire à celle des patients cblC. Cependant, les manifestations neurologiques sont plus sévères avec un retard sévère du développement, une choréoathétose et une épilepsie réfractaire (Watkins et Rosenblatt, 2016). Dans les fibroblastes des patients cblX, le taux de synthèse de la méthylcobalamine et d'adénosylcobalamine est faible avec une diminution de la fonction de la méthylmalonyl-CoA-mutase et de la méthionine synthase. De plus, le niveau d'ARN messenger et de la protéine *MMACHC* est considérablement réduit chez les patients cblX. Ceci montre que la protéine HCFC1 est responsable de l'activation transcriptionnelle du gène *MMACHC*. A noter que le seul critère de différenciation entre les patients cblC et cblX réside dans l'identification de mutations dans le domaine Kelch du gène *HCFC1* chez les patients cblX (Quintana et al, 2015).

II.4 Un nouveau groupe de complémentation ?

En 2016, Pupavac et al ont décrit un patient, qui malgré son phénotype clinique ressemblant à celui d'un patient atteint de défauts génétiques du métabolisme de la cobalamine, spécifiquement cblF et cblJ, n'appartient à aucun groupe de complémentation connu (Pupavac et al, 2016). Chez ce patient, la synthèse d'AdoCbl et de MeCbl est faible et par suite l'activité des deux enzymes MCM et MS est réduite. Dans les fibroblastes de ce patient âgé de 6 mois, la cobalamine s'accumule dans les lysosomes sous la forme CNCbl. Après séquençage de l'ADN de ce patient, deux mutations c.851T>G (p.L284*) et c.1019C>T (p.T340I) du gène *ZNF143* ont été identifiées. Ce gène code pour un activateur de transcription qui interagit avec le co-régulateur de transcription HCFC1 et le facteur de transcription THAP11. Des études faites sur les cellules embryonnaires des souris ont montré que le complexe HCFC1-THAP11 a aussi pour cibles d'autres gènes du métabolisme de la cobalamine comme *MTR* et *ABCD4* (Hung-Chun et al, 2013). Les fibroblastes de ce patient avaient une faible expression du gène *MMACHC* causée par la perte de fonction de la protéine *ZNF143*. De plus, Pupavac et al ont montré que ce défaut génétique entraîne également un autre problème du métabolisme de la vitamine B12. En effet, dans les cellules de ce patient, la cbl reste liée à la transcobalamine dans les lysosomes ce qui suggère la diminution de l'expression d'un gène encore non identifié et régulé par la protéine *ZNF143*.

OBJECTIFS

Des travaux de l'Unité 954 ont démontré l'existence d'une nouvelle interaction entre la méthionine synthase et la protéine MMACHC et ont suggéré que MS joue un rôle crucial dans les mécanismes de régulation intracellulaire du métabolisme de la cobalamine. D'autres interactions ont été aussi démontré entre MTR et MTRR (Leclerc et al, 1998; Yamada et al, 2006), MMADHC et MMACHC (Plesa et al, 2011). En se basant sur ces données, nous avons suggéré que la méthionine synthase serait au cœur d'un large complexe multiprotéique, que nous avons appelé interactome de la méthionine synthase.

Dans ce contexte, nos principaux objectifs sont les suivants :

1. identifier les différents partenaires protéiques (MS, MSR, MMACHC, MMADHC, et les isoformes de MAT) du métabolisme de la cobalamine qui forment cet interactome,
2. étudier l'influence des mutations génétiques présentes dans les fibroblastes des patients cblG, cblE, cblD et cblC sur ces interactions protéiques,
3. identifier la localisation intracellulaire des différents partenaires protéiques,
4. identifier la localisation intracellulaire des interactions protéiques identifiées.

APPROCHE EXPERIMENTALE & METHODOLOGIE

I. Modèle cellulaire :

A. Matériels :

i. Lignées cellulaires :

Des cellules de la lignée cellulaire HepG2, issue d'un hépatocarcinome d'origine humaine ont été utilisées dans notre projet de recherche. Nous avons choisi cette lignée cellulaire cancéreuse en raison de sa capacité de prolifération rapide permettant une production de protéines en grandes quantités. Un autre avantage de cette lignée est l'expression des trois gènes de MAT : *MAT1A*, *MAT2A* et *MAT2B*. Nous avons aussi utilisé les fibroblastes de patients provenant de l'Hôpital Universitaire pour enfants de Zürich en Suisse, de l'Hôpital universitaire de Nancy et de l'Université McGill au Canada. Les caractéristiques de ces lignées sont présentées dans le tableau 5. Toutes les cultures cellulaires ont été réalisées sous une hotte à flux laminaire vertical à poste de sécurité microbiologique (PSM) de classe II.

Identification	Groupe de complémentation	Gène muté	Mutation	Effet de la mutation sur la protéine	Présentation clinique
WT	Contrôle	-	-	-	-
C	cblC	<i>MMACHC</i>	c.271dupA c.271dupA	p.Arg91LysfsX14 p.Arg91LysfsX14	
G*	cblG	<i>MTR</i>	c.609+1088G>A c.609+1088G>A	p.A203EfsX13 p.A203EfsX13	anémie mégaloblastique, hyperhomocystéinémie sévère, hypométhioninémie, faible taux sérique de cobalamine
D	cblD	<i>MMADHC</i>	c.696+1_4delGTGA c.696+1_4delGTGA	p.F204_232del p.F204_232del	Alimentation pauvre, encéphalopathie, convulsions, augmentation du volume globulaire moyen (VGM)
E	cblE	<i>MTRR</i>	c.7A>T c.7A>T	p.R3W p.R3W	

Tableau 5. Caractéristiques des différentes lignées cellulaires étudiées.

ii. Culture en monocouche :

Toutes les lignées cellulaires sont mises en suspension dans une flasque de culture de 75 cm² avec 10 mL du milieu de culture complet composé de DMEM (Gibco/ Invitrogen ; Cergy-Pontoise, France) complétement de 2 mM L-glutamine, 1% de pyruvate de sodium, 1% des antibiotiques Penicilline / Streptomycine et de 10% sérum de veau foetal (SVF) (PAA Laboratoires, France). Puis, les cellules sont incubées à 37°C dans une atmosphère humide contenant 5% CO₂. Le milieu de culture a été renouvelé tous les deux jours. Pour le repiquage des cellules, le tapis cellulaire est rincé une fois à la solution saline tampon phosphate stérile (PBS, sans Ca²⁺ ni Mg²⁺) et mis en présence de trypsine-EDTA 0,05% à raison de 40 µL par cm² à trypsiner. Dès que les cellules se décollent de la boîte, l'activité enzymatique est stoppée en ajoutant du milieu de culture. Les cellules sont centrifugées à température ambiante à 500 tours/min pendant 5 minutes et ensuiteensemencées à raison de 1,5 millions de cellules par flasque de 75 cm².

iii. Transfection des cellules HepG2 par des siARN :

Afin d'inhiber la synthèse des produits des gènes *MTR*, *MTRR*, *MMACHC*, *MMADHC* et *MAT1A*, les cellules HepG2 ont été transfectées par des siARNs correspondants (Life technologies, Saint Aubin, France) :

- Si*MMACHC* : 5'- CAGAAGATCGAGGACACGCTA -3'
- Si*MMADHC* : 5'- CAGAGCCAGACTGGTTTCCTA -3'
- Si*MTR* : 5'-GGAGGAGCAACCACUCAA-3'
- Si*MTRR* : 5'- CTGGGTCTCGGTGATTCAGAA -3'
- Si*MAT1a* : 5'-CTGGATGCCCATCTCAAGCAA-3'

Dans une plaque de culture de 6 puits, les cellules HepG2 sont ensemencées la veille de la transfection à 1.10⁵ par puit dans 2,5 mL du milieu de culture et jusqu'à 60% de confluence. Une heure avant la transfection, le milieu est remplacé par 2.5 ml de milieu DMEM avec 1% pyruvate de sodium sans SVF et sans antibiotiques. Pour chaque transfection, nous avons préparé les solutions suivantes :

- 30 ou 90 μL de Si ARN d'intérêt dans 160 ou 220 μL d'opti-MEM (Gibco/Invitrogen ; Cergy-Pontoise, France) pour un volume final de 250 μL (Tableau 6).
- 4 μL de lipofectamine 2000 (Invitrogen, Saint Aubin, France) dans 246 μL d'opti-MEM pour obtenir un volume final de 250 μL .

Ces deux solutions sont homogénéisées doucement et incubées pendant 5 minutes à température ambiante. Ensuite, la solution de lipofectamine est ajoutée à la solution d'ADN et non l'inverse et incubée pendant 20 minutes à température ambiante avant dépôt goutte à goutte sur les cellules. Les cellules sont incubées à 37°C en atmosphère humide de 5% de CO₂. Après 4 heures, 10% de SVF est ajoutée aux cellules. La plaque est agitée en croix pour bien mélanger le SVF dans le milieu de culture. Elles sont ensuite replacées dans l'incubateur pour une durée de 48 heures.

Si ARN	Volume (μL) pour plaque de 6 puits	Volume (μL) opti-MEM
<i>SiMMACHC</i>	60	190
<i>SiMMADHC</i>	90	160
<i>SiMTR</i>	30	220
<i>SiMTRR</i>	30	220
<i>SiMAT1a</i>	30	220
Lipofectamine	4	246

Tableau 6. Quantités de siARN utilisées pour les transfections.

*Les volumes sont divisés par 4 pour les plaques de 24 puits

iv. Congélation des cellules :

La congélation des cellules est nécessaire pour qu'il y ait toujours des cellules de passage approprié disponibles pour la culture. Le culot des cellules obtenu par centrifugation est suspendu dans un milieu de culture supplémenté par 10% de DMSO. La solution obtenue est ensuite placée dans un cryotube et incubé pendant toute la nuit à -80°C. Ensuite, le tube cryogénique est transféré dans une cuve d'azote liquide. A noter que les tubes

congelés et décongelés doivent être référencés dans les registres de cultures cellulaires.

v. Extraction des protéines pour l'étude par Western Blot :

Lorsque les cellules sont à confluence, elles sont rincées 2 fois par 4 ml de la solution de PBS. Sur la glace, 200 µL du tampon de lyse Radio Immuno Precipitation Assay (RIPA) (Tableau 7) sont ajoutées sur les cellules présentes dans des boîtes de pétri de 100 mm. Ensuite, les cellules sont grattées à l'aide d'un râteau et transférées dans des tubes de 1,5 ml. Après passage du lysat 10 à 20 fois dans une seringue munie d'une aiguille de 0.9 mm de diamètre, 3 cycles de congélation /décongélation (Azote liquide/bain marie à 37°C) ont été effectués. Le lysat était soumis à une sonication pendant 15 minutes à 4°C. Une centrifugation pendant une trentaine de minutes à 12000 rpm et à 4°C a été réalisée pour récupérer le surnageant obtenu.

Tampon RIPA	Concentration
PMSF (Phénylméthanesulfonylfluoride)	10 µL/mL
PIC	10 µL/mL
Na₃VO₄ (Orthovanadate de sodium)	10 µL/mL
NaF (Fluorure de sodium)	10 mM
SDS (Sodium dodecyl sulfate)	0,1%
DOC (Déoxycholate de sodium)	0,5%
Triton X 100	1%
NaCl (Chlorure de sodium)	8 g/L

Tableau 7. Composition du tampon de RIPA

vi. Dosage des protéines par la méthode de l'acide bicinchoninique (BCA) :

La méthode BCA est une méthode de dosage colorimétrique des protéines. Le principe de cette technique est basé sur le pouvoir des protéines de réduire l'ion cuivrique Cu(II) en

ion cuivreux Cu(I) et sur la capacité de l'acide bicinchoninique à former un complexe violet avec les ions cuivreux. Ce complexe présente une forte absorbance entre 540 et 590 nm permettant ainsi le dosage des protéines.

Tout d'abord, une gamme étalon (0, 50, 100, 200, 400, 800, 1200, 1600 et 2000 µg/mL, en triple) doit être préparée à partir d'une solution stock d'ASB (albumine de sérum bovin) à 2 mg/ml diluée dans le tampon de lyse RIPA. 25 µL de chaque dilution d'ASB et de chaque échantillon à doser sont distribués sur une plaque de 96 puits. Pour préparer le réactif de travail, 50 volumes du réactif A (BCA, Protein Assay® Reagen (Uptima)) est mélangé avec 1 volume du réactif B (CuSO₄). Un volume de 200 µL de ce réactif est distribué sur les puits et la plaque est incubée à 37°C pendant trente minutes. L'absorbance est mesurée par un spectrophotomètre lecteur de plaques Victor Wallac Multilabel, Perkin Elmer, à 570 nm. Ensuite, la concentration protéique des échantillons est déterminée à partir de l'équation de droite de la courbe étalon.

vii. Western Blot : immunodétection sur membrane

1. Préparation des gels :

La concentration des gels est choisie selon la taille de la protéine d'intérêt. Pour des protéines de petites tailles, un gel avec un pourcentage élevé doit être utilisé alors que pour les protéines de grandes tailles, un gel de pourcentage moindre est nécessaire. Le tableau 8 nous indique la composition des gels de concentration et de séparation pour SDS-PAGE Tris/Glycine.

Gel de migration		5 mL	10 mL	15 mL	20 mL	25 mL	30 mL	40 mL	50 mL
6 %	H ₂ O MQ	2,7	5,3	8	10,6	13,3	15,9	21,1	26,5
	Acrylamide Mix 29:1	1	2	3	4	5	6	8	10
	Tris 1,5M pH 8,8	1,3	2,5	3,8	5	6,3	7,5	10	12,5
	SDS 10%	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
	APS 10%	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
	TEMED	0,004	0,008	0,012	0,016	0,02	0,024	0,032	0,04
8 %	H ₂ O MQ	2,3	4,6	7	9,3	11,6	13,9	18,6	23,2
	Acrylamide Mix 29:1	1,3	2,7	4	5,3	6,7	8	10,7	13,4
	Tris 1,5M pH 8,8	1,3	2,5	3,8	5	6,3	7,5	10	12,5
	SDS 10%	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
	APS 10%	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
	TEMED	0,003	0,006	0,009	0,012	0,015	0,018	0,024	0,03
10 %	H ₂ O MQ	2	4	5,9	7,9	9,9	11,9	15,8	20
	Acrylamide Mix 29:1	1,7	3,3	5	6,7	8,3	10	13,3	16,6
	Tris 1,5M pH 8,8	1,3	2,5	3,8	5	6,3	7,5	10	12,5
	SDS 10%	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
	APS 10%	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
	TEMED	0,002	0,004	0,006	0,008	0,01	0,012	0,016	0,02
12 %	H ₂ O MQ	1,7	3,3	5	6,6	8,3	9,9	13,2	16,4
	Acrylamide Mix 29:1	2	4	6	8	10	12	14	20
	Tris 1,5M pH 8,8	1,3	2,5	3,8	5	6,3	7,5	10	12,5
	SDS 10%	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
	APS 10%	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
	TEMED	0,002	0,004	0,006	0,008	0,01	0,012	0,016	0,02
15 %	H ₂ O MQ	1,2	2,3	3,5	4,6	5,7	6,9	9,2	11,4
	Acrylamide Mix 29:1	2,5	5	7,5	10	12,5	15	20	25
	Tris 1,5M pH 8,8	1,3	2,5	3,8	5	6,3	7,5	10	12,5
	SDS 10%	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
	APS 10%	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
	TEMED	0,002	0,004	0,006	0,008	0,01	0,012	0,016	0,02

Gel de concentration		1 mL	2 mL	3 mL	4 mL	5 mL	6 mL	8 mL	10 mL
	H ₂ O MQ	0,68	1,4	2,1	2,7	3,4	4,1	5,5	6,8
	Acrylamide Mix 29:1	0,17	0,33	0,5	0,67	0,83	1	1,3	1,7
	Tris 0,5M pH 6,8	0,13	0,25	0,38	0,5	0,63	0,75	1	1,25
	SDS 10%	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,08	0,1
	APS 10%	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,08	0,1
	TEMED	0,001	0,002	0,003	0,004	0,005	0,006	0,008	0,01

Tableau 8. Solution pour préparation des gels de polyacrylamide

2. Préparation des échantillons :

1 volume de tampon de dépôt Laemmli 2X est ajouté pour 1 volume d'échantillon de protéines. Les échantillons sont dénaturés par chauffage à 100°C pendant 5 à 8 min, dans un bloc chauffant.

3. Électrophorèse :

L'électrophorèse permet la différenciation et la caractérisation des protéines chargées négativement placées dans un champ électrique. La séparation des protéines se fait en fonction de leur poids moléculaires à travers le gel de polyacrylamide.

Les échantillons de protéines ainsi que le poids moléculaire sont déposés sur le gel déjà préparé. L'électrophorèse est réalisée dans un système de migration verticale (Mini-PROTEAN® II (Bio-Rad Laboratories, Marnes-la-Coquette, France) dans un tampon de migration à température ambiante. Les protéines migrent à voltage constant de 80 V pendant 30 min, le temps nécessaire pour que les protéines pénètrent dans le gel de concentration. Puis, le voltage est augmenté à 110-120 V jusqu'à ce que le front de migration atteigne le bas du gel.

4. Transfert des protéines sur membrane de PVDF :

La membrane de PVDF est coupée à la dimension du gel : 7x8,5 cm. Elle est immergée dans du méthanol pour son activation, puis trempée dans une solution de transfert avec les papiers filtre à 4°C pendant 15 minutes. Le transfert peut être un électro-transfert semi-sec ou liquide :

- Pour le transfert semi-sec, les différents éléments du sandwich sont superposés sur la plate-forme anodique du système de transfert dans l'ordre suivant :
 - un papier filtre Whatman® 3MM
 - la membrane
 - le gel de polyacrylamide
 - un papier filter Whatman® 3MM

L'appareil de transfert électrophorétique semi-sec Trans-Blot® SD (Bio-Rad Laboratories) est branché sur un générateur de courant continu et transférer à une tension constante de 10 V pendant 45 à 60 minutes (selon la taille de la protéine).

- Pour le transfert liquide, les éléments du sandwich sont superposés dans l'ordre suivant :
 - une éponge
 - un papier filter Whatman® 3MM
 - la membrane de PVDF
 - le gel de polyacrylamide
 - un papier filter Whatman® 3MM
 - une éponge

L'appareil de transfert électrophorétique Mini-Trans-Blot Cell (Bio-Rad Laboratories) est branché sur un générateur de courant continu et transférer à ampérage constant de 350 mA pendant 45 minutes.

5. Immunoblot:

Selon l'anticorps utilisé, le tampon de blocage est fait soit avec du lait écrémé soit avec de la BSA. La membrane est placée dans la solution de blocage pendant une heure à température ambiante et sous agitation lente. Le but du blocage est de saturer les sites aspécifiques de la membrane. Ensuite, la membrane est incubée toute la nuit à 4°C avec un anticorps primaire (Tableau 7) spécifique de la protéine d'intérêt et dilué à 1/700 dans le tampon de blocage dans de petits sacs en plastique scellés. Après quatre lavages de 10 minutes avec du tampon de lavage TBST, la membrane est incubée dans la solution d'anticorps secondaire pendant une heure sous agitation rotative lente à température ambiante. Suite à 4 lavages avec du TBST, la révélation est réalisée par chimioluminescence en utilisant le réactif ECL (Bio rad, USA) et visualisée avec le détecteur de Fusion FX7 (ThermoFisher)

viii. Immunofluorescence :

Dans une plaque de culture de 24 puits, les lamelles sont traitées par une solution de poly-L-lysine diluée à 1/700 avec de l'eau stérile pendant 4 heures. 1.10^5 de cellules HepG2 et $1,5.10^5$ de fibroblastes sont ensemencés sur chaque lamelle et incubés toute la nuit à 37°C pour atteindre une confluence de 60%. Les cellules sont ensuite rincées une fois avec une solution de PBS contenant 0,1 M de glycine pendant 5 minutes. Pour assurer une perméabilisation de la membrane cellulaire, les cellules sont trempées pendant 10 minutes dans une solution de triton 0,1% (Triton X-100/PBS). Ensuite, elles sont rincées avec une solution de PBS contenant du tween (1%) pendant 5 minutes puis par une solution de PBS. Le blocage est réalisé pendant une heure par une solution de BSA à 5% et à température ambiante. Ensuite, la plaque est incubée avec des anticorps primaires (anti-MTR, anti-MTRR, anti-MMACHC, anti-MMADHC, anti-MAT1A, anti-MAT2A, anti-MAT2B) toute la nuit à 4°C (Tableau 9). Le lendemain, le rinçage des lamelles est fait 4 fois pendant 5 minutes par une solution de TBST 1X. Puis la plaque est incubée avec une solution d'anticorps secondaire pendant une heure à température

Anticorps primaires	Hôte	Fournisseurs	Références
MTR	Rabbit	Abcam	Ab66039
MTRR	Rabbit	Abcam	Ab129159
MMACHC	Mouse	Neuro-Mab	75-239
MMADHC	Mouse	M Baumgartner (Zürich)	
MAT1A	Rabbit	Novus Biologicals	NPB1-55120
MAT2A	Rabbit	Novus Biologicals	NB110-94158
MAT2B	Rabbit	Novus Biologicals	NBP1-82797
MTR	Goat	Abcam	Ab9209

Tableau 9. Anticorps primaires utilisés

ambiante et sous agitation rotative. Après 2 rinçages avec une solution de PBS, les cellules sont incubées dans une solution de 4',6'-diamidino-2-phénylindol (DAPI) (1/200) pendant 30 secondes suivi par 4 rinçages au PBS. Les lamelles sont ensuite montées sur des lames avec une goutte de solution de montage « faramount mounting medium » (DAKO, Carpinteria, CA, USA). Les lamelles sont maintenues dans la chambre froide toute la nuit et à l'abri de la lumière pour sécher. L'analyse des lames est réalisée par microscopie confocale (Nikon C2).

ix. Duolink :

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 coupes de tissus ou des cellules adhérentes préparées pour la microscopie. Les cibles sont détectées par des anticorps primaires qui sont à leur tour reconnus par des anticorps secondaires conjugués aux oligonucléotides (sonde PLA MOINS et sonde PLA PLUS). Lorsque les sondes PLA sont suffisamment proches (28\AA), 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. 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 une tache fluorescente rouge individuelle qui peut être quantifiée et localisée par microscopie confocale.

1. Protocole d'analyse :

Après ensemencement de 1.10^5 de cellules HepG2 et $1,5.10^5$ de fibroblastes pendant 24 heures, les cellules sont fixées sur les lamelles par une solution de paraformaldéhyde à 4% (PAF 4%). Le rinçage de la plaque de 24 puits se fait 3 fois pendant 5 minutes avec 500 μL par puit de PBS 1X. Cette étape est suivie par incubation des lamelles pendant une dizaine de minutes avec 500 μL d'une solution de triton à 0,1%. Après blocage de 30

minutes, les anticorps primaires (anti-MTR, anti-MTRR, anti-MMACHC, anti-MMADHC, anti-MAT1A, anti-MAT2A, anti-MAT2B) sont dilués a 1/1000 dans une solution de BSA de 5% dans du PBS 1X et ajoutés immédiatement sur les cellules dans la chambre froide toute la nuit (Tableau 7).

2. Sondes PLA :

Après élimination des solutions d'anticorps primaires (Tableau 7), les sondes PLA anti-chèvre PLUS, anti-lapin MINUS, anti-lapin PLUS et anti-souris MINUS sont diluées a 1/5 avec la solution de BSA de 5%. Les lamelles sont ensuite incubées pendant une heure dans une chambre humide préchauffée à 37°C.

3. Protocole de détection :

Après élimination et rinçage des solutions des sondes PLA, les cellules sont ensuite incubées pendant une demi-heure, dans une solution de ligation contenant 1/5 de tampon de ligation et 1/40 de tampon de ligase dilués dans de l'eau ultra pure à 37°C. Les lamelles sont rincées deux fois avec du tampon de PBS 1X pendant 5 minutes. En travaillant sous une lumière rouge ou à l'abri de la lumière, la solution d'amplification est préparée à partir de la dilution de 1/5 de tampon d'amplification et de 1/80 de tampon de polymérase dans de l'eau milli-Q. 100 µL de la solution d'Amplification-Polymérase sont ajoutées aux lamelles et la plaque est incubée pendant deux heures dans une chambre préchauffée à 37°C. Après rinçage, la plaque est incubée pendant 30 secondes avec une solution de 1/200 de DAPI diluée dans de l'eau ultra pure. Cette solution nécessaire pour le marquage des noyaux est ensuite rincée par de TBST 1X 2 fois pendant 10 minutes. Les lamelles sont montées sur des lames avec une goutte de liquide de montage de lames et elles sont séchées à l'abri de la lumière (dans une boîte à lames) à 4°C.

x. Immunoprécipitation (IP) :

1. Extraction des protéines :

Après l'ajout de 200 μ L de tampon d'IP (0.01% PMSF, 0.01% PIC, 0.01% Na₃VO₄, 0.025 M Tris-HCl, 0.001 M EDTA (acide éthylène diamine tétra acétique), 5% glycérol, 0.15 M NaCl, 1% IGEPAL (octylphenoxy-polyethoxyethanol)), trois cycles de congélation et de décongélation sont effectués sur les cellules HepG2 ou les fibroblastes. Les tubes contenant les cellules sont centrifugés pendant 10 minutes à 20 000 tours par min à 4°C et le surnageant est récupéré.

2. Immunoprécipitation de la protéine cible :

Pour éliminer toutes les protéines de liaisons aspécifiques, 500 μ g de protéines déjà extraites sont ajoutées à 20 μ l de la protéine A/G d'agarose ou résine et laissées sous agitation lente pendant une 1 heure. Ce mélange est ensuite centrifugé pendant une minute à 20000 tours et le surnageant est jeté. 5 μ l d'anticorps (anti-MTR, anti-MTRR, anti-MMACHC, anti-MMADHC, anti-MAT1A, anti-MAT2A, anti-MAT2B) et 200 μ l de tampon d'IP sont ajoutés à l'échantillon et ce complexe est incubé sous agitation lente à 4°C toute la nuit. Le lendemain, la résine ou la protéine d'agarose A/G est lavée par 100 μ l du tampon d'IP et centrifugée pendant une minute à 10,000 g. Le complexe de protéines est ensuite ajouté à la résine bien nettoyée et ce mélange est incubé à température ambiante sous agitation lente pendant une heure. Après centrifugation pendant 1 min à 20000 g, le surnageant est jeté et le lavage par le tampon d'IP est réalisé 3 fois suivi par un lavage une seule fois avec le tampon de 0.15 M NaCl. Le culot de résine formé est resuspendu dans 50 μ l de tampon Laemmli 2X et chauffé pendant 8 minutes à 100°C. Ce mélange subit une centrifugation à 12,000 g pendant une vingtaine de secondes. Le surnageant est enfin transféré dans un nouveau tube.

xi. Fractionnement cytoplasmique et nucléaire :

Le fractionnement cytoplasmique et nucléaire est réalisé avec le ParisTM Kit (Thermo Fischer Scientific). Après repiquage des cellules, 300-500 μ L de tampon de fractionnement est ajouté au culot cellulaire. La re-suspension des cellules est effectuée doucement par pipetage. Sur la glace, les cellules sont incubées pendant 5 à 10 minutes. Ensuite, les échantillons sont centrifugés pendant 5 minutes à 500 g et à 4°C. Le

surnageant qui est la partie cytoplasmique de la cellule est aspiré et déposé dans un tube séparément. 300-500 μL de tampon de rupture de cellules (Cell Disruption Buffer) sont ajoutés sur le culot nucléaire restant. Le lysat nucléaire doit être bien homogénéisé vigoureusement par pipetage.

RESULTATS

A. Expression de MS, MSR, MMACHC et MMADHC :

Avant de commencer l'identification de l'interactome de la méthionine synthase, nous avons vérifié l'expression des quatre protéines MS, MSR, MMACHC et MMADHC dans les cellules HepG2 et dans les fibroblastes témoins, cblC, cblG variant, cblE et cblD. La protéine de référence utilisée pour le western blot est la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) (Figure 19).

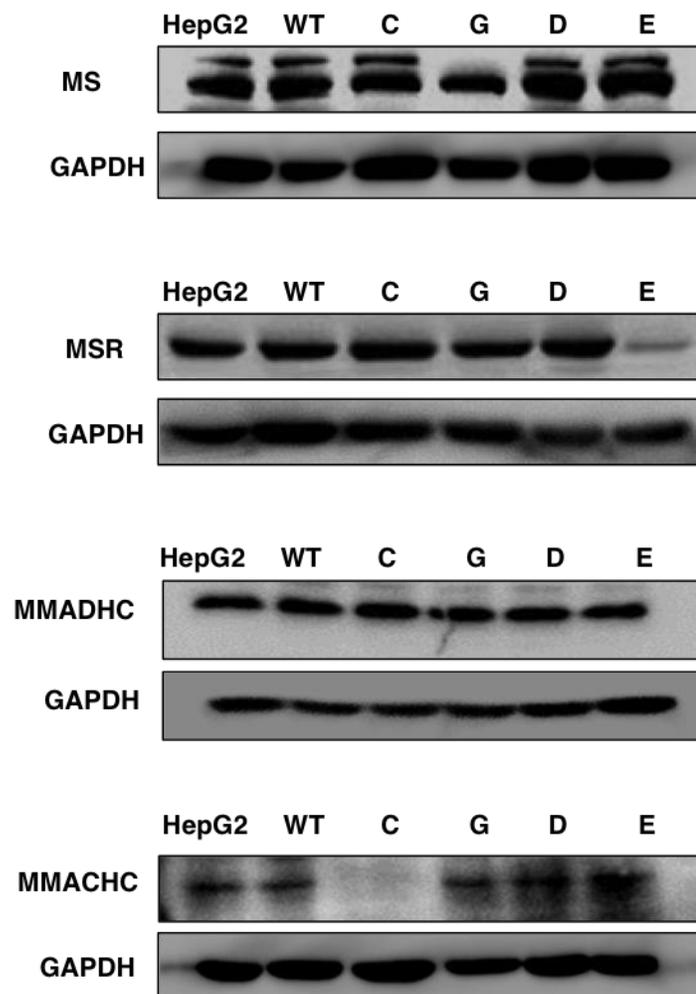


Figure 19 : Expression de MS, MSR, MMADHC et MMACHC. *Western blot des isoformes 140 kDa et 124 kDa de la méthionine synthase, de la méthionine synthase réductase, de MMACHC et de MMADHC dans des cellules HepG2, des fibroblastes*

témoin (WT), et des patients cblC (C), cblG-variant (G), cblD (D) et cblE (E). La GAPDH a été utilisée comme protéine de référence.

Comme prévu, la protéine MMADHC est présente dans les cellules HepG2 et dans toutes les lignées cellulaires de fibroblastes des patients. La protéine MMACHC est exprimée dans les cellules HepG2 et dans tous les fibroblastes sauf dans la lignée cblC. L'absence d'expression de MMACHC dans les fibroblastes de ce patient cblC est expliquée par la présence de la mutation c.271dupA dans les deux allèles conduisant à une terminaison prématurée de la traduction (p.Arg91LysfsX14). La protéine MSR est aussi bien exprimée dans toutes les lignées cellulaires à l'exception des fibroblastes du patient cblE ayant une mutation faux sens. La substitution de l'adénine en position 7 par une thymine conduit probablement à une perturbation de l'épissage normal (Tableau 5).

Comme mentionné antérieurement, les travaux réalisés par l'U954 dans les cellules CaCo2 ont démontré que la protéine MS est exprimée sous deux isoformes de 124 kDa et 140 kDa. Il a été rapporté que la variation du rapport entre la forme active (140 kDa) et la forme non active (124 kDa) dépend du stade de prolifération des cellules. Dans les cellules HepG2, le western blot montre la présence des deux isoformes de MS (Figure 20). Leur expression augmente pendant la période de prolifération. Les valeurs de densitométrie des bandes des protéines ont été normalisées par rapport à la protéine de référence GAPDH. Les données ont été comparées par une analyse de variance (One-Way Anova) avec le test de Fisher, avec $n = 8$ dans chaque groupe, et présentées sous forme de la moyenne \pm écart-type (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). Chez les patients, nos résultats indiquent que tous les fibroblastes expriment ces deux isoformes de la MS sauf la ligne cellulaire cblG variant où la forme active n'est pas exprimée.

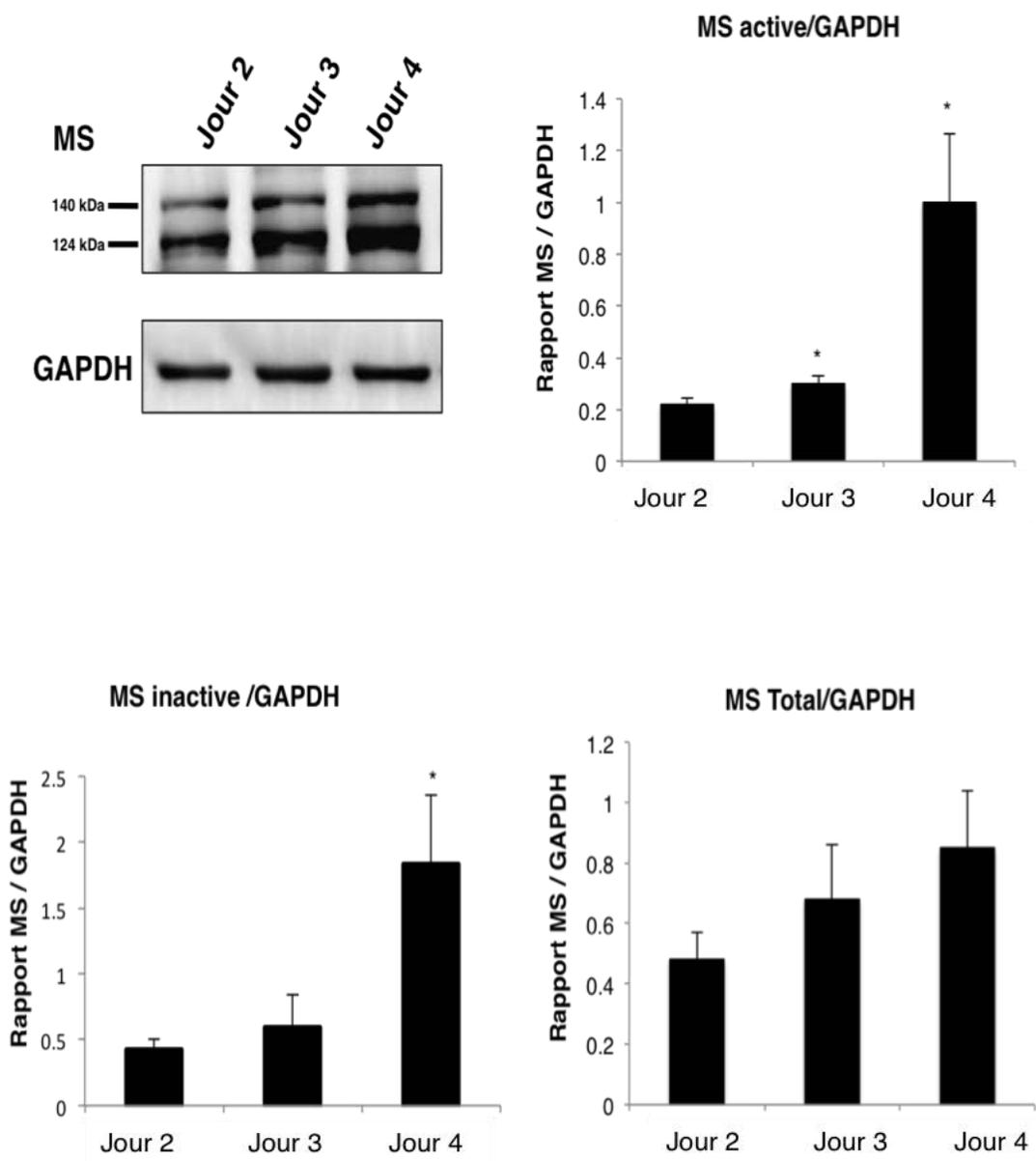


Figure 20 : Expression des isoformes de MS selon le stade de prolifération.

Western blot de MS dans les cellules HepG2 selon le stade de prolifération cellulaire : stade de prolifération (Jours 2 et 3) et stade de confluence (Jour 4). Une analyse densitométrique a été réalisée à partir de trois différents westerns. Les tests statistiques Analyse de variance (Anova) à un facteur « one way » et le test post-hoc Tukey ont été utilisés pour comparer les moyennes pendant les différents stades de prolifération ($P < 0,05$ par rapport au jour 4)*

B. Identification de nouvelles interactions : MS/MMADHC, MSR/MMADHC et MSR/MMACHC

Suite à la découverte de l'interaction entre MS et MMACHC et sachant que MS interagit également avec MSR, et que MMACHC interagit avec MMADHC, nous avons émis l'hypothèse que toutes ces interactions pourraient avoir lieu dans un complexe multiprotéique que nous avons appelé interactome. Dans ce cas, MS pourrait interagir avec MMADHC et MSR pourrait interagir avec MMACHC et MMADHC. Afin de tester cette hypothèse, nous avons utilisé deux techniques expérimentales de façon systématique : la co-immunoprécipitation et la méthode de Duolink.

i. Résultats obtenus par co-immunoprécipitation :

Après co-immunoprécipitation des protéines d'intérêt MS, MSR, MMACHC et MMADHC avec des anticorps spécifiques polyclonaux (anti-MS) et monoclonaux (anti-MSR, anti-MMACHC, anti-MMADHC) liés à des billes d'agarose A/G, nous avons analysé les partenaires de chacune des protéines par une série de Western blot. Les résultats obtenus montrent la présence d'une interaction entre MS/MMADHC, entre MSR/MMADHC et entre MSR/MMACHC (Figure 21). Pour confirmer les résultats obtenus, nous avons répété les co-immunoprécipitations sur des lysats de cellules HepG2 transfectées par des siARN dirigés contre les différentes protéines impliquées : MS, MSR, MMACHC et MMADHC. Les résultats obtenus par western blot ont montré une diminution de l'interaction entre MS et MMACHC après transfection par un siARN dirigé contre le gène *MMACHC*, de l'interaction entre MMACHC et MMADHC après transfection par un siARN dirigé contre le gène *MMACHC* et de l'interaction MS/MSR et MS/MMADHC après transfection par un siARN dirigé contre le gène *MTR*. Nos résultats ont montré aussi une disparition des interactions MSR/MS, MSR/MMACHC et MSR/MMADHC après knock-down du gène *MTRR*, des interactions MMADHC/MS et MMADHC/MSR après knock-down du gène *MMADHC*, des interactions MMACHC/MSR et MMADHC/MMACHC après knock-down du gène *MMACHC* et des

interactions entre MS/MMACHC après knock-down du gène *MTR*. Ces résultats confirment la spécificité des signaux observés.

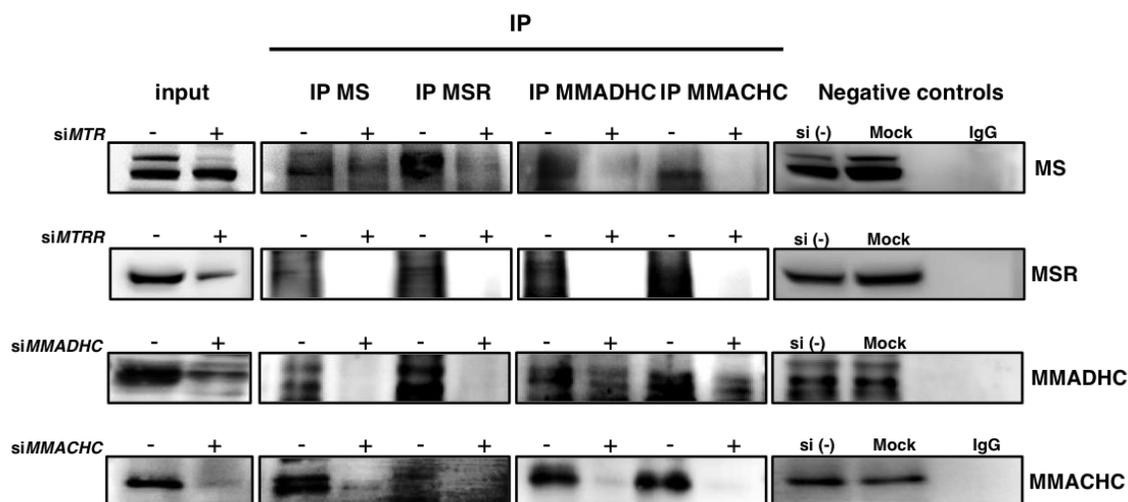


Figure 21 : Mise en évidence par co-immunoprécipitation des interactions protéiques MS/MSR, MS/MMACHC, MS/MMADHC, MSR/MMACHC, MSR/MMADHC et MMADHC/MMACHC dans les cellules HepG2. La technique de co-immunoprécipitation a été réalisée sur des cellules HepG2 en utilisant des anticorps anti-MS, anti-MSR, anti-MMACHC et anti-MMADHC avant et après knock-down des gènes *MTR*, *MTRR*, *MMACHC* et *MMADHC* par transfection avec des siARN correspondants. Les témoins négatifs sont des échantillons immunoprécipités avec des anticorps IgG (IgG), des échantillons provenant de cellules transfectées avec un siARN contrôle qui ne cible aucun transcrite de mammifère (si (-)) et des échantillons provenant de cellules transfectées sans siARN (mock).

ii. Résultats obtenus par la technique de Duolink® in situ proximity ligation assay :

Les expériences de Duolink® in situ proximity ligation assay ont été réalisées dans des cellules HepG2 en présence de différents anticorps dirigés contre les protéines MS, MSR, MMACHC et MMADHC (Figure 22). Les spots fluorescents rouges détectés en

microscopie confocale montrent clairement l'existence d'interactions entre MS/MSR, MS/MMACHC, MS/MMADHC, MSR/MMACHC et MSR/MMADHC. Ces interactions sont localisées dans le cytoplasme et dans le noyau. Afin de déterminer si ces protéines interagissent d'une façon séquentielle ou en formant un complexe multiprotéique, nous avons examiné les conséquences de la diminution d'expression de MS et de MMACHC sur les interactions précédemment rapportées. Nous avons réalisé une transfection des cellules HepG2 par des siARN ciblées contre les gènes *MTR* et *MMACHC*. D'après les diagrammes correspondant au comptage du nombre de spots rouges (Figure 23), le knock-down du gène *MTR* est à l'origine d'une absence complète des interactions entre MS et MSR, entre MS et MMACHC et entre MS et MMADHC. D'une façon imprévue, la sous-expression de la protéine MS a aussi induit une diminution statistiquement significative du nombre de spots fluorescents rouges concernant les interactions MSR/MMACHC et MSR/MMADHC. Ces résultats suggèrent l'importance de la méthionine synthase dans ces deux interactions.

Comme le montre la figure 24, le knock-down de *MMACHC* a conduit à une diminution significative des interactions entre MSR/MMADHC, MS/MMACHC, MSR/MMACHC et entre MS/MSR alors que l'interaction MSR/MMADHC est la seule à ne pas être significativement affectée par ce knock-down.

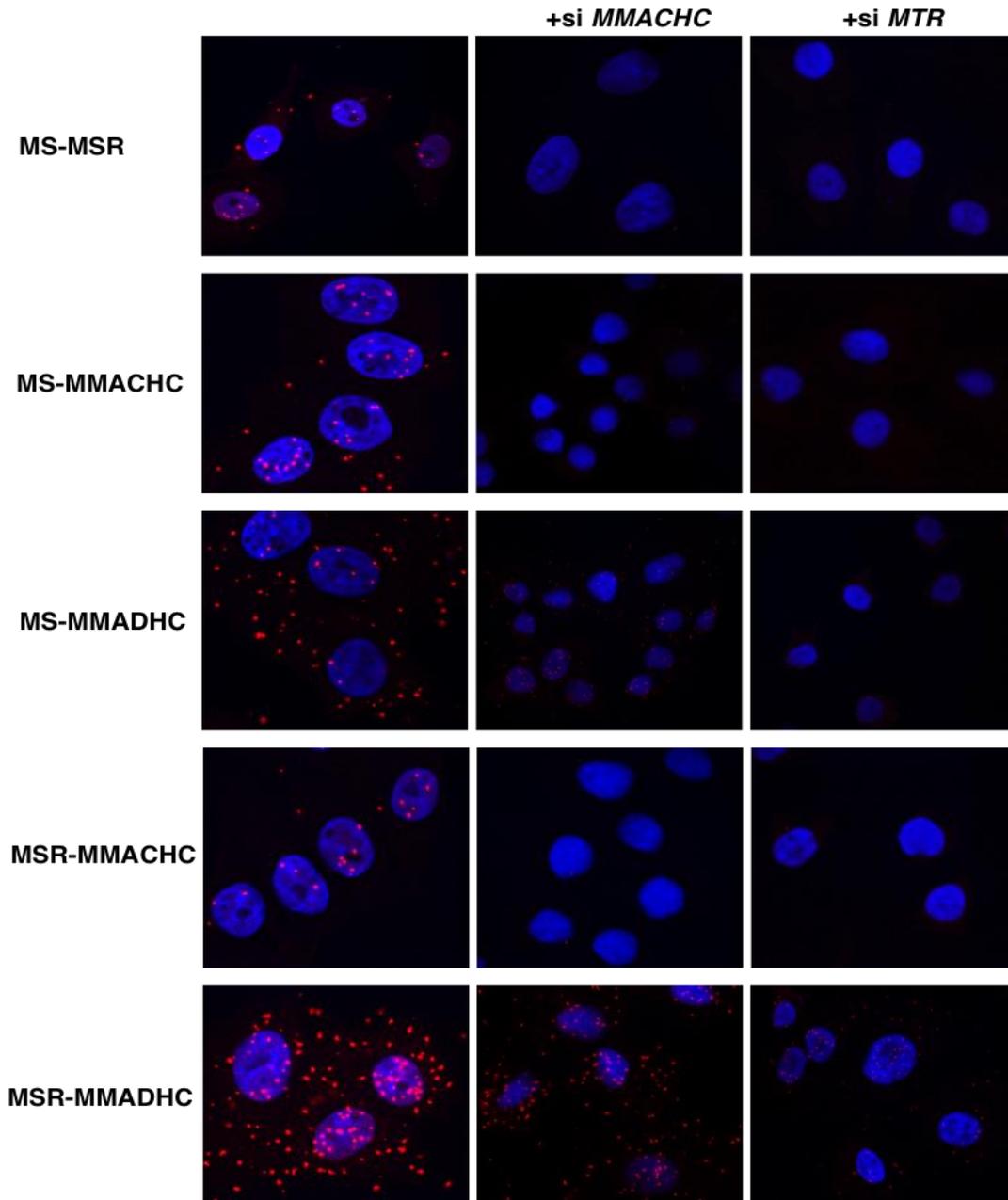


Figure 22 : Mise en évidence des interactions protéiques entre MS/MSR, MS/MMACHC, MS/MMADHC, MS/MMACHC, MSR/MMADHC et MMADHC/MMACHC par des expériences de Duolink® in situ proximity ligation assay dans les cellules HepG2. Les expériences de Duolink® in situ proximity entre MS/MSR, MS/MMACHC, MS/MMADHC, MSR/MMACHC, MSR/MMADHC et MMADHC/MMACHC ont été effectués dans les cellules HepG2 avant et après la transfection avec les siARN dirigés contre les gènes *MTR* et *MMACHC*.

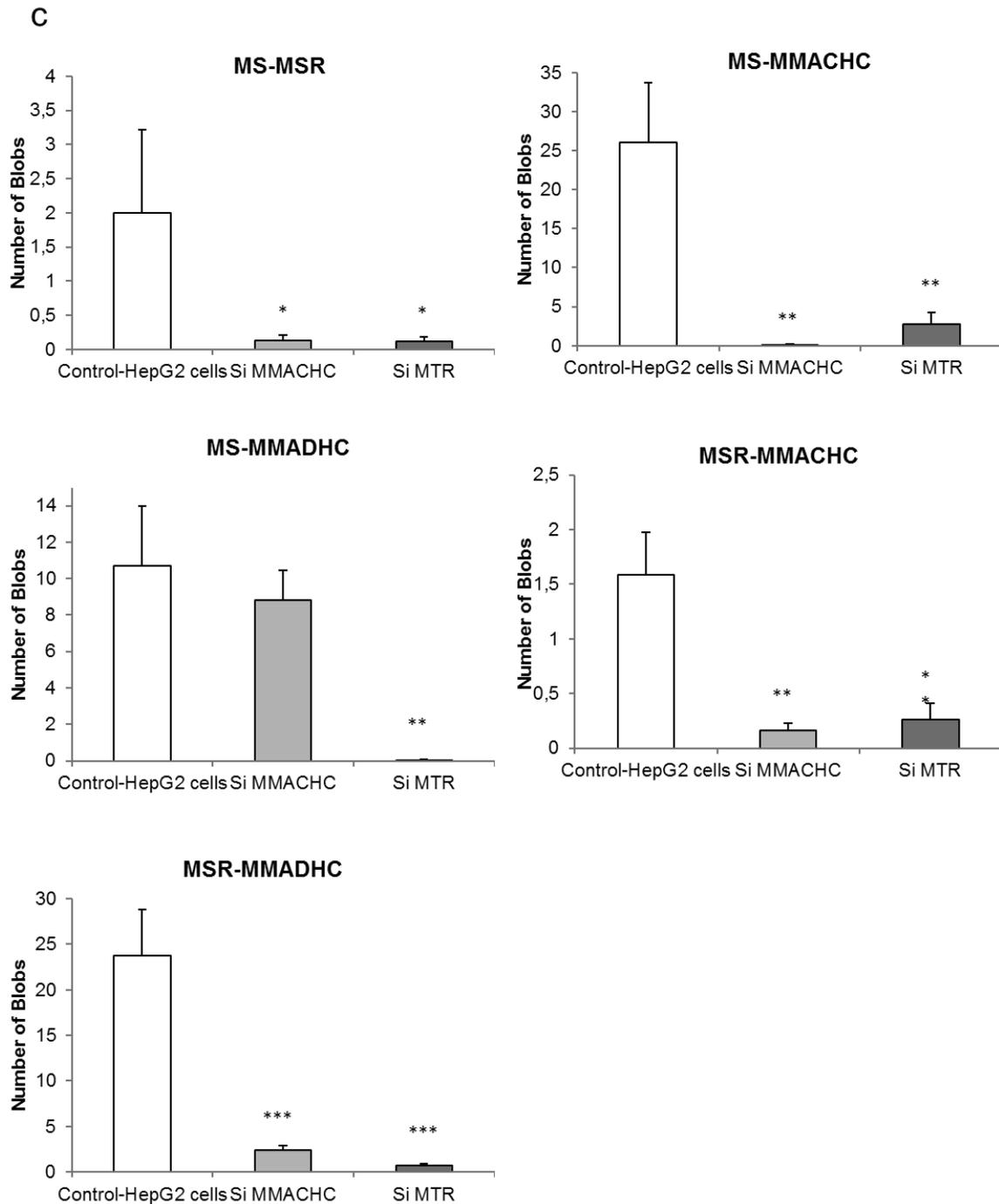


Figure 23 : Quantification des interactions détectées par DuoLink. *La quantification des interactions a été réalisée par comptage du nombre moyen de spots par cellule d'au moins 30 cellules, et est représentée par des histogrammes (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $p < 0,001$)*

C. Confirmation des interactions dans les fibroblastes des patients :

i. Résultats obtenus par co-immunoprécipitation :

Afin d'évaluer les conséquences des mutations des gènes *MTR* et *MMACHC* sur les interactions rapportées précédemment, nous avons effectué une série de co-immunoprécipitations sur des fibroblastes d'un patient cblC (p.Arg132*) et d'un patient cblG-variant (p.A203EfsX13) (Tableau 5). La figure 24 montre le résultat des western blots réalisés après co-immunoprécipitation des lysats des fibroblastes des deux patients cblC et cblG-variant en utilisant les anticorps anti-MS, anti-MSR, anti-MMACHC et anti-MMADHC. Les co-immunoprécipitations effectuées sur des fibroblastes contrôle (WT) ont été utilisées comme contrôle positif. Tout d'abord, les résultats obtenus sur les fibroblastes contrôle confirment les interactions rapportées sur les cellules HepG2. En outre, l'analyse des résultats de co-IP sur les fibroblastes cblC et cblG-variant montre une diminution importante de l'interaction entre MS et MMACHC comparativement aux fibroblastes contrôles. De plus, les autres interactions MS/MSR, MS/MMADHC, MSR/MMADHC, MSR/MMACHC sont moins importantes dans les fibroblastes de patients cblC et cblG-variant. Un résultat inattendu concerne l'interaction entre MMACHC et MMADHC où une diminution plus importante a été observée dans les fibroblastes cblG-variant en comparaison avec les fibroblastes cblC.

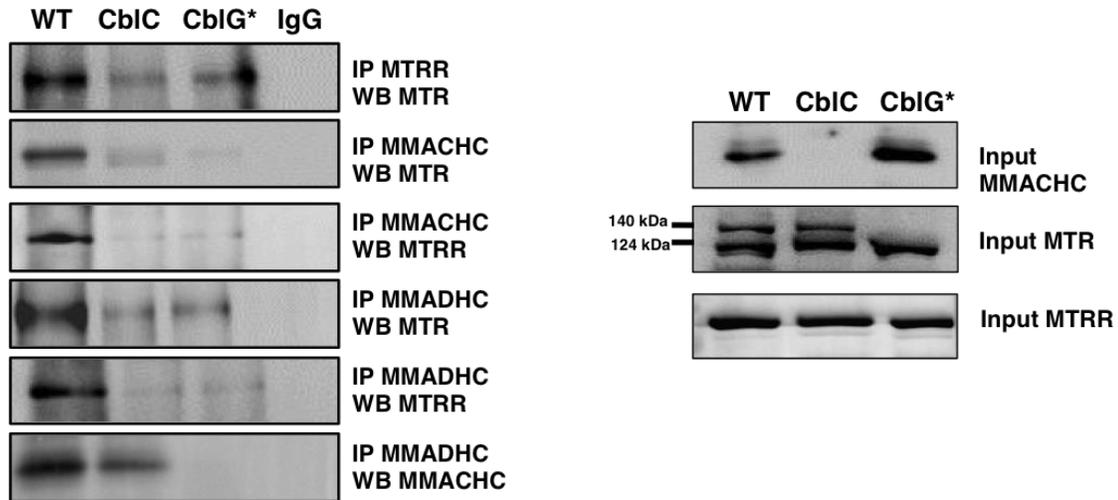


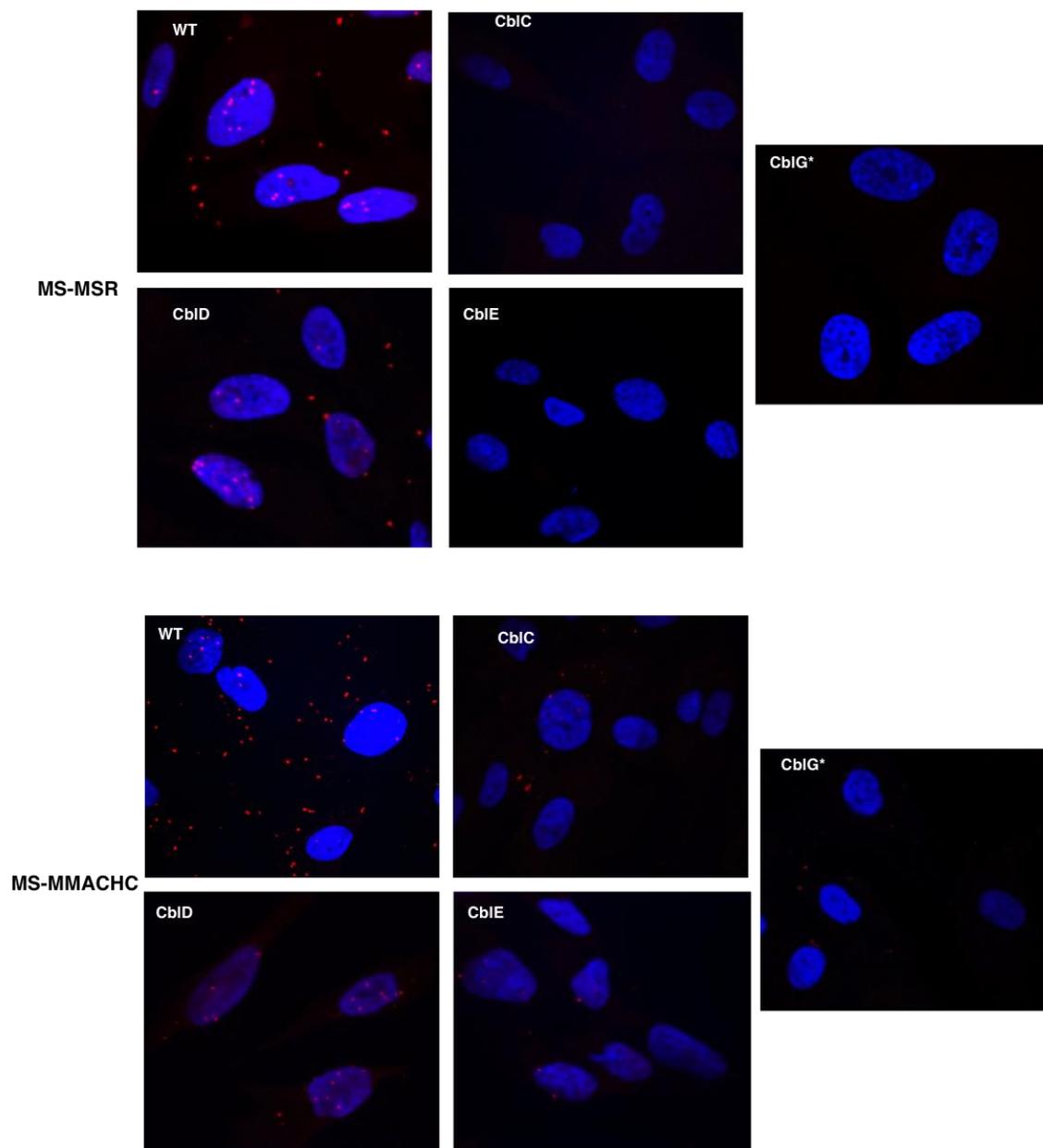
Figure 24 : Mise en évidence des interactions protéiques entre MS/MSR, MS/MMACHC, MS/MMADHC, MSR/MMACHC, MSR/MMADHC et MMADHC/MMACHC dans les fibroblastes contrôle (WT) et de deux patients cblC et cblG-variant par co-immunoprécipitation.

La technique de co-immunoprécipitation a été réalisée avec des fibroblastes contrôle (WT) et de deux patients cblC et cblG-variant en utilisant des anticorps contre MS, MMACHC et MMADHC. Ces échantillons ont été analysés par western blot pour MS, MSR ou MMACHC.

- ii. Résultats obtenus par la technique de Duolink® in situ proximity ligation assay dans les fibroblastes des patients cblC, cblG-variant, cblE, cblD et du contrôle (WT) :

Pour confirmer les résultats obtenus précédemment par co-immunoprécipitation dans les fibroblastes cblC et cblG-variant et pour explorer les effets des mutations des 2 gènes *MTRR* et *MMADHC* dans les cellules de patients cblE et cblD, nous avons utilisé la technique de Duolink. Le patient cblE a une mutation homozygote de substitution c.7A>T sur le gène *MTRR* (p.R3W). Le patient cblD porteune mutation homozygote c.696+1_4delGTGA sur le gène *MMADHC* provoquant ainsi une délétion de 28 acides aminées (p.F204_232del) de la protéine MMADHC. En comparant les données obtenus chez les fibroblastes contrôles avec ceux obtenus chez les fibroblastes des 4 patients

(Figures 25 et 26), nous avons remarqué une diminution statistiquement significative des cinq interactions MS/MMADHC, MSR/MMADHC, MS/MMACHC, MSR/MMACHC et MS/MSR chez les patients cblC, cblG-variant, cblE et cblD. Chez le patient cblD, les interactions MMADHC/MS et MMADHC/MSR ont diminué significativement contrairement aux 3 autres interactions MS/MMACHC, MSR/MMACHC et MS/MSR.



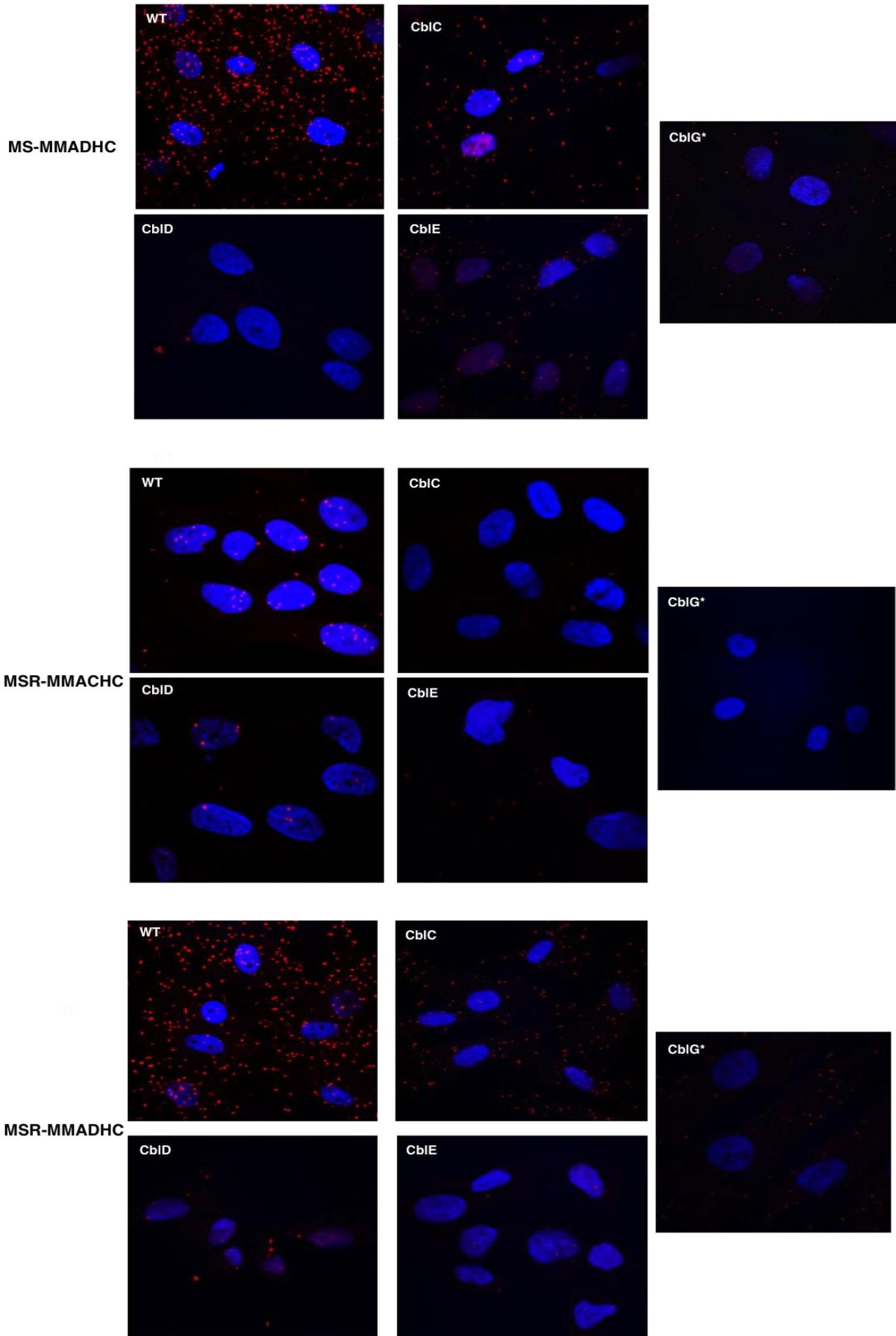


Figure 25 : Confirmation des interactions protéiques entre MS/MSR, MS/MMACHC, MS/MMADHC, MSR/MMACHC, MSR/MMADHC et MMADHC/MMACHC sur les fibroblastes des patients.

Les expériences de Duolink® in situ proximity entre MS/MSR, MSR/MMACHC, MS/MMADHC, MSR/MMACHC et MSR/MMADHC ont été réalisées sur les fibroblastes contrôle (WT) et des quatre patients cblC, cblE, cblD et cblG-variant.

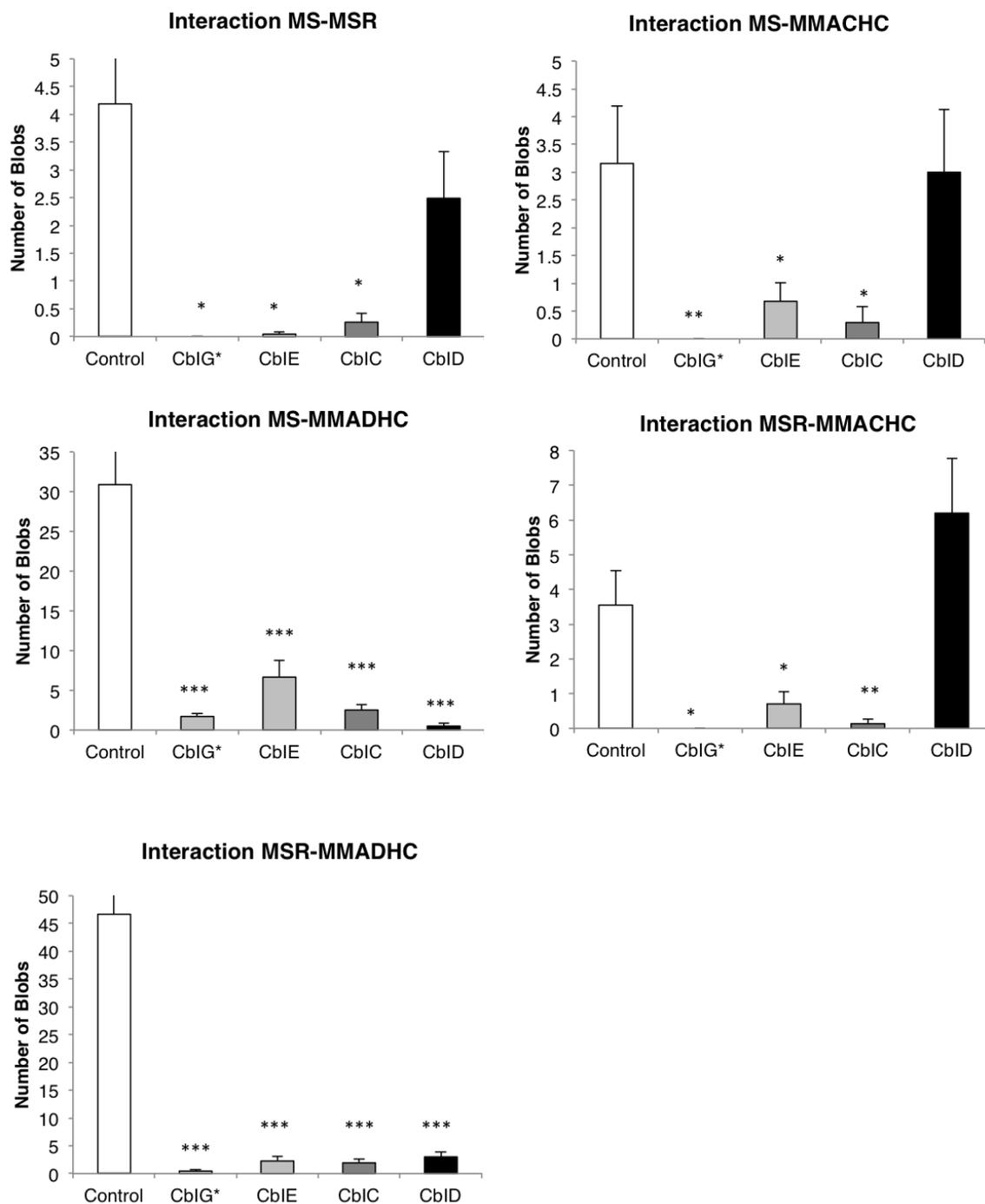


Figure 26 : Quantification des interactions de l'interactome de MS.

La quantification des interactions a été réalisée par comptage du nombre moyen de spots par cellule d'au moins 30 cellules, et est représentée par des histogrammes ($P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $p < 0,001$)*

D. Localisation intracellulaire des protéines MS, MSR, MMACHC, MMADHC, MAT1A, MAT2A, MAT2B dans les cellules HepG2 :

i. Résultats obtenus par immunofluorescence :

Nous avons utilisé la technique d'immunofluorescence pour déterminer la localisation des protéines MS, MSR, MMACHC, MMADHC, MAT1A, MAT2A, MAT2B dans les cellules HepG2. Nous avons également réalisé une série de témoins négatifs pour nous assurer de la spécificité du signal. Les cellules HepG2 ont été marquées avec des anticorps anti-MS, anti-MSR, anti-MMACHC, anti-MMADHC, anti-MAT1A, anti-MAT2A et anti-MAT2B. La Figure 27 montre la localisation cellulaire de ces 7 protéines après observation au microscope confocal. Pour la protéine MS et la protéine MSR, elles sont localisées presque exclusivement dans le compartiment cytoplasmique. La protéine MMACHC a une localisation cytoplasmique et nucléaire alors que la protéine MMADHC est uniquement localisée dans le compartiment cytoplasmique. La localisation des sous-unités codées par le gène *MAT1A* est cytoplasmique et nucléaire. Les produits des gènes *MAT2A* et *MAT2B* sont localisés uniquement dans le compartiment cytoplasmique.

ii. Résultats obtenus par fractionnement cellulaire :

Après fractionnement des cellules HepG2 en deux compartiments : cytoplasmique et nucléaire, des westerns blots pour les 7 protéines d'intérêt ont été effectués pour confirmer les données précédentes. Les résultats de localisation sont identiques à ceux obtenus avec la technique d'immunofluorescence. L'analyse des résultats montre que les 3 protéines MS, MSR et MAT2A présentent une localisation majoritairement cytoplasmique et faiblement nucléaire. La figure 28 montre aussi que les deux protéines MMADHC et MAT2B sont localisées exclusivement dans le noyau alors que les deux protéines MMACHC et MAT1A ont une double localisation cytoplasmique et nucléaire.

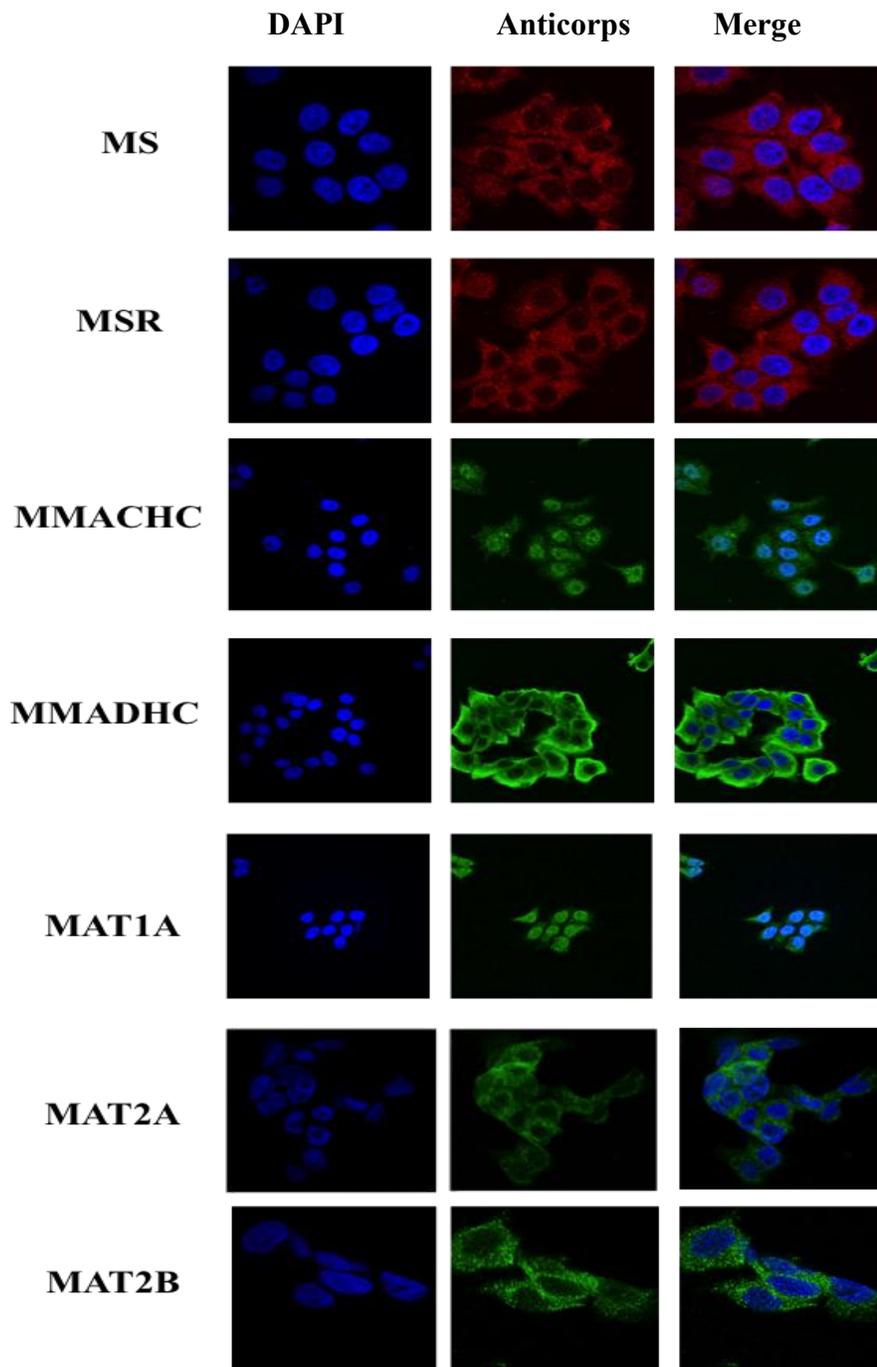


Figure 27 : Localisation intracellulaire des protéines MS, MSR, MMACHC, MMADHC, MAT1A, MAT2A, MAT2B dans les cellules HepG2 par immunofluorescence observée par microscopie confocal.

Marquage des cellules HepG2 avec des anticorps anti-MS, anti-MSR, anti-MMACHC, anti-MMADHC, anti-MAT1A, anti-MAT2A et anti-MAT2B. Les noyaux cellulaires sont

marqués en bleu par le DAPI. MS et MSR sont marquées en rouge par l'anticorps secondaire lapin rouge. MMACHC et MMADHC sont marquées en vert par les anticorps secondaire souris rouge tandis que MAT1A, MAT2A et MAT2B sont marquées en vert par l'anticorps secondaire lapin rouge.

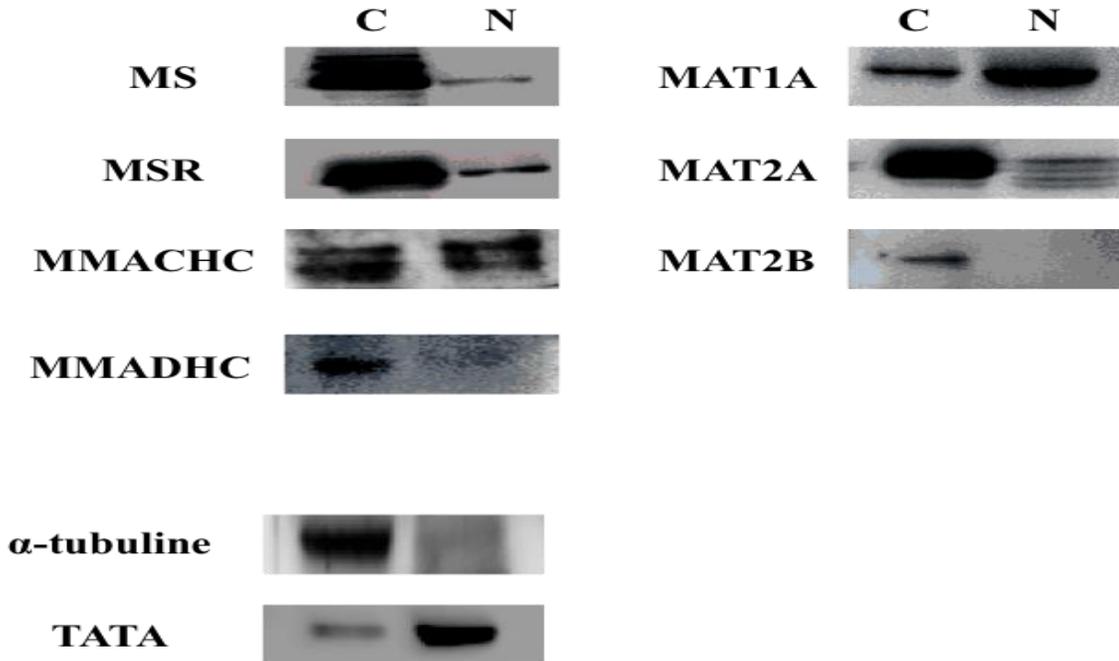


Figure 28 : Localisation intracellulaire des protéines MS, MSR, MMACHC, MMADHC, MAT1A, MAT2A et MAT2B dans les cellules HepG2 par western blot après fractionnement cellulaire.

La protéine α -tubuline a été utilisée comme un marqueur cytoplasmique et la protéine de liaison à la boîte TATA a été utilisée comme un marqueur nucléaire.

E. Identification de l'interaction potentielle entre la protéine MS et les trois isoformes de MAT :

Après confirmation des interactions entre les quatre protéines MS, MSR, MMACHC et MMADHC, nous avons également testé l'hypothèse d'une interaction entre MS et les isoformes MAT1A, MAT2A et MAT2B. Les techniques de Duolink et la technique

d'immunoprécipitation ont été utilisées pour explorer cette hypothèse dans les cellules HepG2.

Dans un premier temps, nous avons immunoprécipité les protéines des cellules HepG2 en présence des anticorps anti-MS, anti-MAT1A, anti-MAT2A, anti-MAT2B et anti-IgG liés à des billes d'agarose A/G. L'immunoprécipitation a été suivie par un western blot de la protéine MS. Les résultats (Figure 29) suggèrent que la méthionine synthase interagit avec les 3 isoformes : MAT1A, MAT2A et MAT2B. Afin de valider les résultats obtenus, nous avons répété la même manipulation mais sur des protéines issues des cellules d'HepG2 transfectées par un siARN dirigé contre le gène *MTR*. Le western blot effectué montre une disparition presque complète des interactions entre MS/MAT1A, MS/MAT2A et MS/MAT2B. Ces résultats confirment ainsi la spécificité des signaux obtenus précédemment.

Dans un second temps et pour confirmer les résultats obtenus par immunoprécipitation, nous avons réalisé des expériences de Duolink dans les cellules HepG2 en présence de différents anticorps dirigés contre les protéines MS, MAT1A, MAT2A et MAT2B. Les cellules sont immunomarquées par 4 anticorps dirigés contre MS, MAT1A, MAT2A et MAT2B. L'interprétation des résultats du Duolink (Figure 29) montre des spots fluorescents rouges entre MS/MAT1A, MS/MAT2A et MS/MAT2B détectés par microscopie confocale et localisées dans les deux compartiments cytoplasmiques et nucléaires. Ces résultats confirment l'existence d'interactions entre MS et les trois isoformes de MAT.

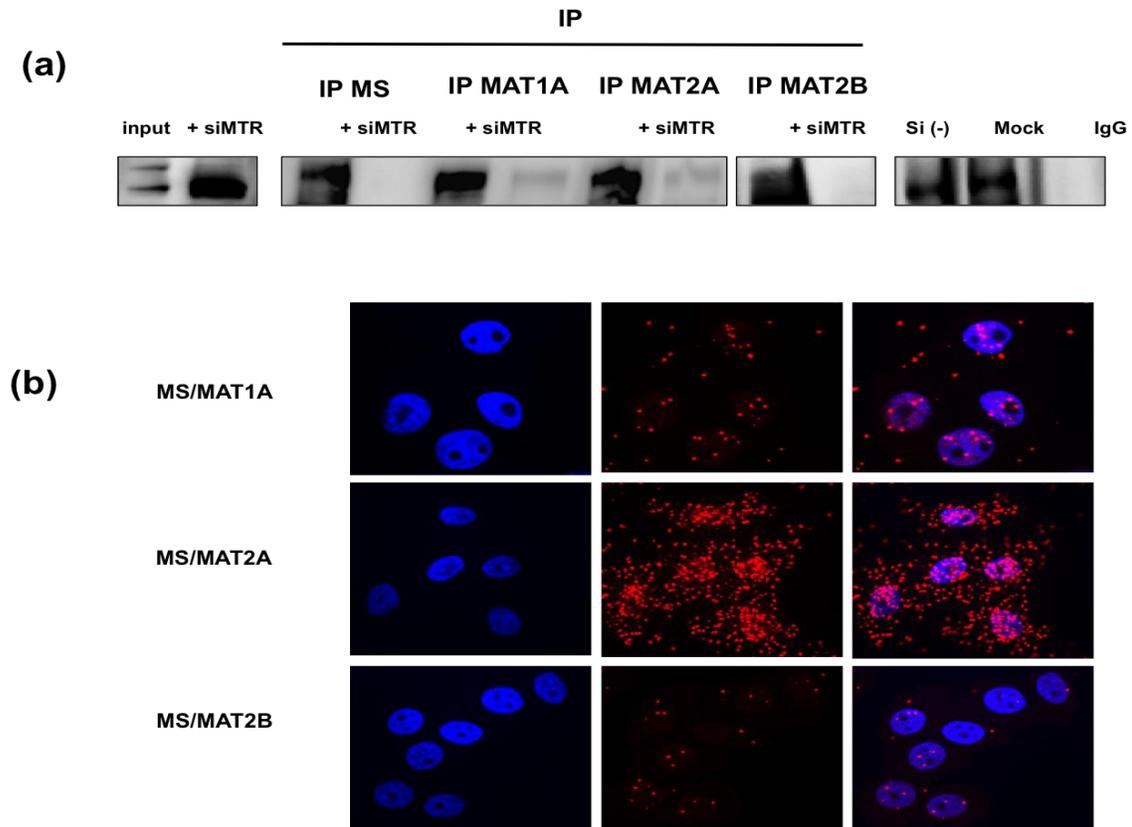


Figure 29 : Mise en évidence des interactions protéiques entre MS/MAT1A, MS/MAT2A et MS/MAT2B.

(a) Co-immunoprécipitation réalisée sur des protéines issues des cellules HepG2 en présence des anticorps anti-MS, anti-MAT1A, anti-MAT2A et anti-MAT2B avant et après knock-down du gène MTR par transfection avec un siARN. Les témoins négatifs sont des échantillons immunoprécipités avec des anticorps IgG (IgG), des échantillons provenant de cellules transfectées avec un siARN contrôle qui ne cible aucun transcrite de mammifère (si (-)) et des échantillons provenant de cellules transfectées sans siARN (mock).

(b) Les expériences de Duolink ont été effectuées sur des lysats des cellules HepG2 immunomarquées par des anticorps dirigés contre MS, MAT1A, MAT2A et MAT2B

F. Localisation intracellulaire des interactions entre MS/MSR, MS/MMACHC, MS/MAT1A, MS/MAT2A et MS/MAT2B après knockdown de MAT1A :

Nous avons émis l'hypothèse que MAT1A pourrait être responsable de la localisation nucléaire de l'interactome MS. Pour tester cette hypothèse, nous avons transfecté des cellules HepG2 par un siARN dirigé contre le gène *MAT1A*. Puis sur ces cellules transfectées, nous avons réalisé une série d'expériences de Duolink® in situ proximity ligation assay pour déterminer la localisation des interactions MS/MTRR, MS/MMACHC, MS/MAT1A, MS/MAT2A et MTR/MAT2B. La Figure 30 montre une diminution de l'interaction MTR/MAT1A après knock-down de *MAT1A*. De plus, les spots rouges correspondant aux interactions entre MS/MSR, MS/MMACHC, MS/MAT2A et MS/MAT2B sont moins nombreux. Leur localisation n'a pas varié et reste cytoplasmique et nucléaire.

G. Localisation intracellulaire de MS, MSR, MMACHC, MMADHC, MAT2A et MAT2B après knockdown de MAT1A :

Après transfection des cellules HepG2 par un siARN dirigé contre *MAT1A*, un fractionnement cellulaire a été réalisé. Dans un premier temps, nous avons effectué un western blot pour vérifier l'efficacité du knock-down de *MAT1A*. Comme le montre la Figure 31, l'expression de la protéine MAT1A dans les fractions nucléaires et cytoplasmique transfectées a diminuée significativement par rapport aux fractions contrôles. Dans un second temps, des westerns-blots ont été effectués sur les deux fractions transfectées pour déterminer la localisation intracellulaire de MS, MSR, MMACHC, MMADHC, MAT2A et MAT2B. Comme le montre la Figure 31, les protéines MS, MSR, MMADHC, MAT2A et MAT2B sont localisées majoritairement dans le cytoplasme alors que MMADHC a une double localisation cytoplasmique et nucléaire. Ainsi, nos résultats montrent que la localisation des protéines de l'interactome MS n'a pas variée après knock-down de *MAT1A*.

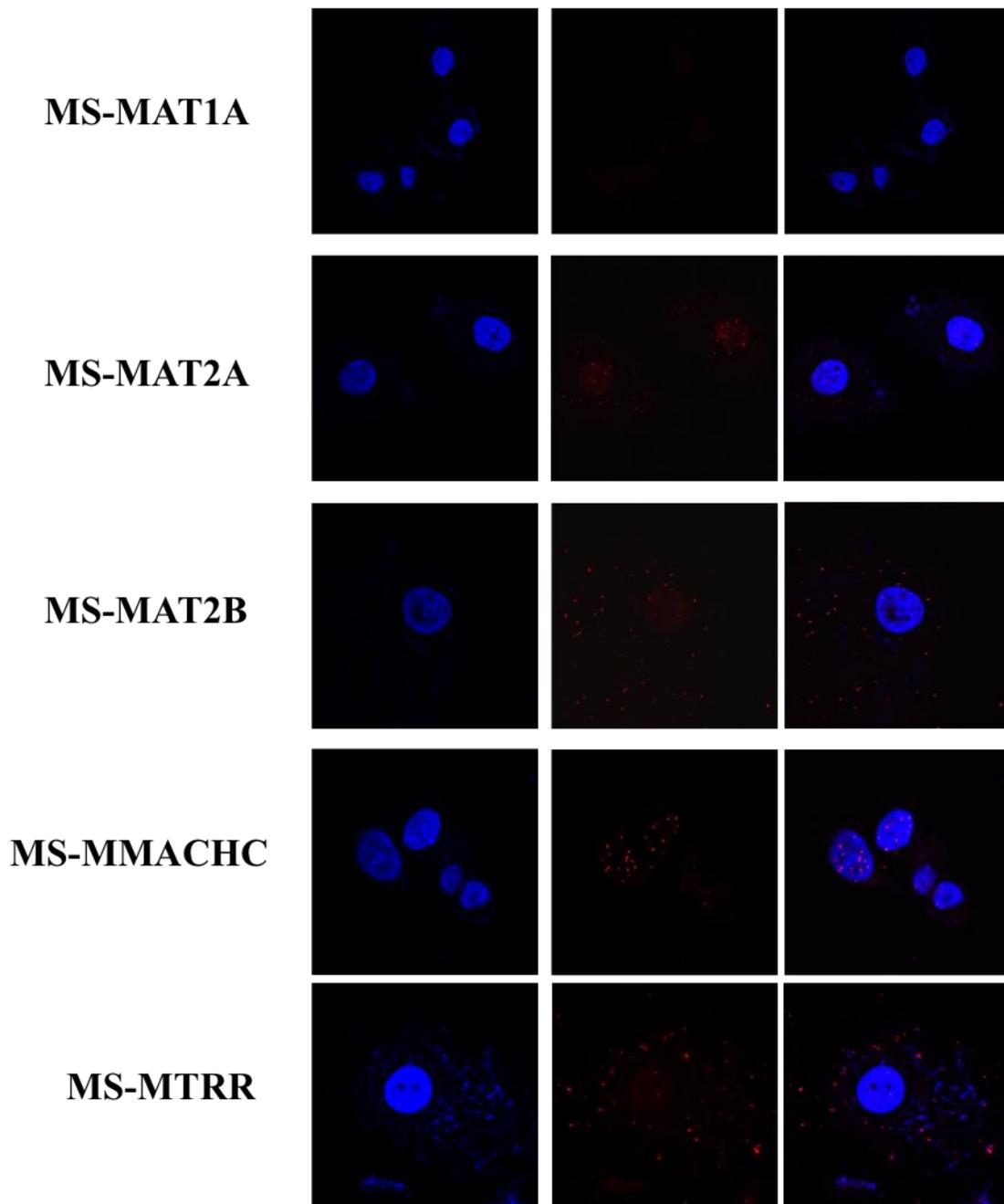


Figure 30 : Localisation intracellulaire des interactions MS/MSR, MS/MMACHC, MS/MAT1A, MS/MAT2A et MS/MAT2B après knock-down de *MAT1A*.

*Les expériences de Duolink entre MS/MSR, MS/MMACHC, MS/MAT1A, MS/MAT2A et MS/MAT2B ont été effectuées dans les cellules HepG2 après leur transfection avec des siARN dirigés contre le gène *MAT1A**

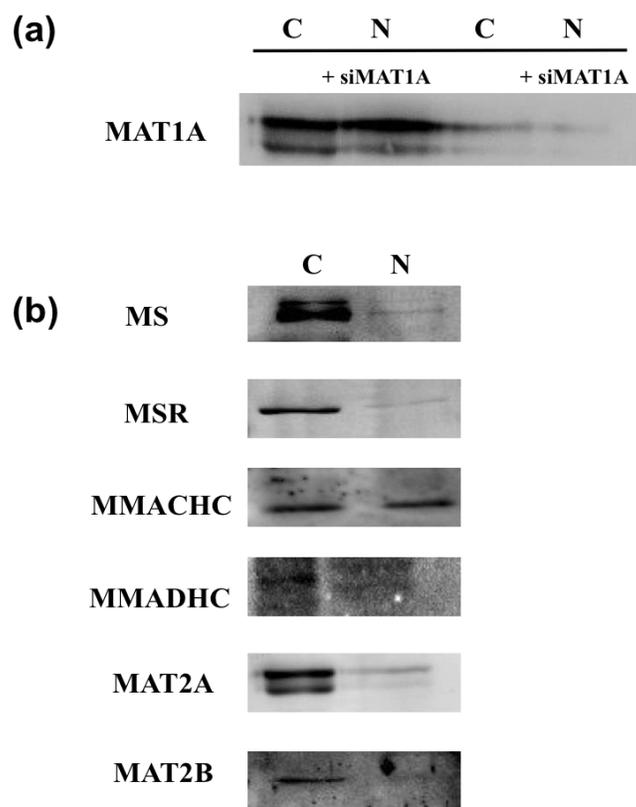


Figure 31 : Localisation intracellulaire des protéines MS, MSR, MMACHC, MMADHC, MAT1A, MAT2A et MAT2B après knock-down de *MAT1A*.

(a) Western blot des lysats cytoplasmiques et nucléaires avant et après transfection par un siARN dirigé contre MAT1A en présence de l'anticorps dirigé contre MAT1A.

(b) Western-blots des fractions cytoplasmiques et nucléaires des lysats des cellules HepG2 transfectées par siARN contre MAT1A en présence des anticorps anti-MAT1A, anti-MS, anti-MSR, anti-MMACHC, anti-MMADHC, anti-MAT2A, anti- MAT2B.

DISCUSSION

La méthionine synthase est au carrefour du cycle des folates et de celui de la méthionine. Des données récentes ont mis en évidence de nombreuses interactions entre les différentes protéines du métabolisme de la vitamine B12. Ceci a été démontré entre MS et MSR (Leclerc et al, 1997 ; Yamada et al, 2006) et entre MMACHC et MMADHC (Plesa et al, 2011). L'interaction entre MMACHC et les isoformes de MS, récemment documenté dans la littérature, suggère que MS a une fonction régulatrice sur l'activité de MMACHC et ainsi sur le métabolisme intracellulaire de la Cbl (Fofou-Caillerez et al, 2013).

Sur la base de ces données bibliographiques et de ces travaux effectués au sein de l'unité 954, nous avons alors choisi d'étudier les interactions de la MS avec MSR, MMACHC, MMADHC, MAT I, MAT II, MAT III afin de tester l'hypothèse selon laquelle ces protéines formeraient un complexe protéique multifonctionnel.

I. Expression de MS, MSR, MMACHC et MMADHC

Avant de tester les interactions protéiques impliquant MS dans les cellules HepG2 et dans les fibroblastes des patients cblC, cblG, cblG-variant, cblE et cblD, il était important de vérifier les éventuels changements d'expression des quatre protéines MS, MSR, MMACHC et MMADHC dans ces différentes lignées cellulaires par western blot (Figure 19). Concernant la MS, la présence des deux isoformes (140 kDa et 124 kDa) est confirmée par l'étude de Fofou-Caillerez et al. De plus, l'expression unique de l'isoforme 124 kDa de la MS dans les fibroblastes du patient cblG-variant homozygote confirme les travaux réalisés par l'U954 dans les cellules CaCo2 (Fofou-Caillerez et al, 2013). En fait, ces fibroblastes ne produisent pas le transcrite MTR-001 responsable de la synthèse de la MS fonctionnelle de 140 kDa. L'absence d'expression de MMACHC dans les fibroblastes du patient cblC est expliquée par la présence de la mutation hétérozygote c.271dupA dans les deux allèles conduisant à une terminaison prématurée de la traduction (p.Arg91LysfsX14). La protéine MSR n'est pas exprimée dans les fibroblastes du patient cblE ayant la mutation faux sens c.7A>T (p.R3W). Cette mutation conduit probablement à une perturbation de l'épissage normal, de l'initiation de la synthèse ou même de la stabilité de la protéine. Malgré la présence de la mutation 696+1_4delGTGA

(p.F204_232del) homozygote chez le patient cblD, la protéine MMADHC est détectable dans les fibroblastes de ce patient. Ceci peut s'expliquer par le fait que cette délétion provoque un saut de l'exon 7 respectant le cadre de lecture (Coelho et al, 2008) et par la suite la production d'une protéine MMADHC incomplète.

Selon une étude antérieure de l'U954, l'expression de MS est modifiée selon les différents stades de prolifération (Fofou-Caillierez et al, 2013). En fait, dans les cellules Caco2, l'intensité de la bande correspondante de la forme 124 kDa est augmentée tandis que celle de l'isoforme de 140 kDa est diminuée lorsque les cellules sont à confluence (Fofou-Caillierez et al, 2013). Ces observations nous ont incité à étudier l'expression de MS dans les cellules HepG2 par western blot. Nos résultats montrent une augmentation de l'expression des deux isoformes de MS dans ces lignées cellulaires à confluence (Figure 20). La contradiction entre nos résultats et l'étude de Fofou-Caillierez et al. peut suggérer que l'expression de MS dépend non seulement du stade de prolifération cellulaire mais également du type de lignée cellulaire

II. Identification de nouvelles interactions : MS/MMADHC, MSR/MMADHC et MSR/MMACHC

Un nombre croissant d'études a rapporté des interactions entre certaines protéines, qui pourraient participer aux mécanismes de régulation de la cobalamine. Ceci a été documenté entre MS et MSR (Leclerc et al, 1998; Yamada et al, 2006), MMADHC et MMACHC (Plesa et al, 2011), et MMACHC et les isoformes de MS (Fofou-Cailliez et al, 2012). Afin d'étudier les interactions potentielles entre MS et MMADHC, MSR et MMADHC et MSR et MMACHC, nous avons réalisé une série d'expériences de co-immunoprécipitation et de DuoLink in situ sur les cellules HepG2. Les résultats de western blot de ces co-IP et du Duolink confirment les interactions précédemment décrites dans la littérature (MS et MSR, MMDAHC et MMACHC, MS et MMACHC) et mettent également en évidence les nouvelles interactions MS/MMADHC, MSR/MMACHC, MSR/MMADHC (Figure 21 et 22). Puis, pour confirmer les résultats obtenus, nous avons décidé de répéter les co-IP et les Duolink sur des fibroblastes de

patients cblC et cblG* et sur les cellules HepG2 après transfection par des siRNA dirigés contre les gènes codant pour MS, MSR, MMACHC et MMADHC. Nous avons vérifié l'efficacité du knock-down de ces quatre protéines par western blot. Les résultats de co-IP et de Duolink réalisées sur ces cellules transfectées ont montré une diminution allant parfois jusqu'à l'absence de signal de l'interaction impliquant la protéine visée par le siRNA. Ceci confirme la spécificité de ces interactions.

Nos résultats et les données bibliographiques rapportant une interaction entre MS/MSR, MMACHC/MMADHC et MS/MMACHC suggèrent que ces interactions protéiques permettent d'éviter l'exposition de la cobalamine au milieu cellulaire (Gherasim et al, 2013 ; Lerner-Ellis et al, 2009 ; Kim et al, 2008 ; Zhou et al, 2008 ; Stucki et al. 2012). L'insertion de la cobalamine dans la méthionine synthase, sa réactivation et sa stabilisation nécessitent la formation du complexe MS-MSR. En effet, le domaine de liaison de la SAM localisé sur la partie C-terminale de la MS interagit avec le domaine FMN situé dans la partie N-terminale de la MSR (Wolthers et al, 2006 ; Wolthers et al, 2009). Concernant le complexe MS/MMACHC, des travaux antérieurs de l'U954 ont suggéré que le domaine de liaison de la cobalamine de la MS est impliqué dans l'interaction avec la protéine MMACHC. 38 résidus de la région située entre les positions Leu696 et Val765 interagissent avec 43 résidus de MMACHC. Les résidus 80, 109-111, 144-161 et 200-230 de MMACHC sont probablement impliqués dans la formation de ce complexe. Dans le cytoplasme, la cob(II)alamine peut être livré directement à MS grâce à son interaction avec MMACHC (Fofou-Caillierez et al, 2013). Ces données suggèrent que les régions nécessaires pour l'interaction MS/MSR sont différentes de celles impliquées dans l'interaction MS/MMACHC.

L'interaction entre MMACHC et MS se produit soit en même temps soit après l'interaction entre MMACHC et MMADHC. L'interaction entre MMACHC et MMADHC observée dans les cellules HepG2 et dans les fibroblastes est rapportée par plusieurs études dans la littérature. En 2011, Plesa et al ont pu définir cinq régions de la protéine MMADHC impliquées dans la formation du complexe avec MMACHC. Les deux premières régions sont les régions I (142-150) et II (157-169) alors que les trois autres régions sont situées sur la partie C-terminale de la protéine : région III (220-236),

région IV(246–256) et région V (280–290). La même équipe a ensuite démontré que les résidus de la partie N-terminale de MMADHC contribuent à la conformation tridimensionnelle de cette protéine mais qu’elles ne sont pas impliquées dans son interaction avec MMACHC (Deme et al, 2012). De plus, MMADHC est incapable de lier la cobalamine. Ces auteurs ont alors proposé que la fonction de MMADHC dans la régulation de la réparation de la Cbl entre la synthèse d’ AdoCbl et celle de MeCbl se fasse par son extrémité C-terminale en interagissant avec MMACHC dans le cytoplasme (Deme et al, 2012). En 2015, Froese et al ont démontré que les 154 premiers acides aminés de MMADHC sont suffisants pour interagir avec MMACHC (Froese et al, 2015).

Concernant la protéine MMACHC, les cinq régions impliquées dans le complexe MMACHC/MMADHC sont la région I (34-57), la région II (221-238), la région III (236-250) et la région IV (261-280) (Deme et al, 2013). Mais en 2015, Froese et al ont montré que les résidus situés dans la région III et la région IV situées dans la partie C-terminale de MMACHC ne sont pas nécessaires pour la formation du complexe avec MMADHC. Bien que les deux équipes aient travaillé sur des protéines recombinantes purifiées de MMADHC et de MMACHC, les résultats de ces deux publications sont contradictoires. Ceci est probablement dû à l’utilisation de deux techniques différentes pour identifier les régions requises pour l’interaction entre ces MMACHC ET MMADHC. En fait, Froese et al ont utilisé la technique d’électrophorèse en gel de polyacrylamide natif (BN-PAGE) alors que Deme et al ont employé la technique de Phage Display qui produit des résultats qui ne sont que prédictifs.

III. Effets des siMMACHC et siMTR et des mutations chez les patients cblC et cblG* sur les interactions entre MS, MSR, MMACHC et MMADHC

Pour étudier les conséquences des mutations des gènes *MMACHC* et *MTR* sur les interactions entre MS, MSR, MMACHC et MMADHC, nous avons travaillé avec des cellules HepG2 transfectées par des siARN dirigées contre *MMACHC* et *MTR*. Les

résultats obtenus ont ensuite été confirmés par des expériences utilisant des fibroblastes de deux patients cblC et cblG*.

Nos résultats obtenus dans les cellules HepG2 transfectées par un siARN contre *MMACHC* et dans les fibroblastes cblC ont montré que *MMACHC* joue un rôle important dans la formation des complexes MS/MSR, MS/MMADHC et MSR/MMADHC (Figure 24 et 25).

En effet, nos résultats montrent que la protéine *MMACHC* est importante pour l'interaction de *MMADHC* avec *MS* et *MSR* et pour l'interaction de *MS* avec *MSR*. Différentes études avaient mis en évidence l'interaction *MS/MSR*, sans avoir évoqué la participation de *MMACHC* (Ref). Par contre, nos résultats ont été obtenus à l'aide de cellules humaines sans surexpression des gènes impliqués. On ne peut donc pas exclure l'hypothèse selon laquelle *MMACHC* pourrait contribuer à la stabilité de l'interaction *MS/MSR* dans le milieu cellulaire. Deux études ont montré que *MSR* améliore l'absorption de *Cbl* par l'apoenzyme *MS* et par la suite la formation de l'holoenzyme *MS*. De plus, l'interaction *MS/MSR* est nécessaire pour l'insertion de *Cbl* dans la protéine *MS* (Yamada et al, 2006 ; Wolthers et al, 2009). Ceci pourrait suggérer que la cobalamine est présentée à la méthionine synthase par l'intermédiaire de la protéine *MMACHC*. De plus, l'absence de *MS* inhibe les interactions *MSR/MMADHC*, *MSR/MMACHC* et *MMADHC/MMACHC*.

Pris dans leur ensemble, ces données suggèrent que ces interactions ont lieu dans un grand complexe multiprotéique et multifonctionnel contenant *MMACHC*, *MMADHC*, *MS*, et *MSR*, dans lequel la présence de chaque protéine contribue à la stabilisation des autres interactions.

IV. Localisation intracellulaire des protéines *MS*, *MSR*, *MMACHC*, *MMADHC*, *MAT1A*, *MAT2A* et *MAT2B* dans les cellules HepG2

De nombreux travaux se sont intéressés à la localisation intracellulaire des protéines *MS*, *MSR*, *MMACHC*, *MMADHC*, et des 3 isoformes de *MAT*. L'identification et la

confirmation de la localisation de ces protéines permettront de mieux comprendre leur rôle dans la voie intracellulaire de la vitamine B12. Pour déterminer la localisation cytoplasmique ou nucléaire de ces 6 protéines, nous avons effectué une série de westerns blot sur les lysats du cytoplasme et du noyau des cellules HepG2.

Selon nos résultats (Figure 27 et 28), MS et MSR sont localisées majoritairement dans le cytoplasme. La localisation cytoplasmique de MS détectée dans nos expériences confirme les résultats obtenus par avec plusieurs études dans la littérature (Chen et al, 1995 ; Wilson et al, 1998 ; Froese et al, 2008 ; Shin et al, 2014). Puisque sa protéine cible, MS, est cytoplasmique, Leclerc et al ont suggéré que MSR est également localisée dans le compartiment cytoplasmique (Leclerc et al, 1998). Par épissage alternatif, les deux sites d'initiation de transcription trouvés dans le gène *MTRR* permettent la transcription de deux isoformes de 698 aa et 725 aa. La séquence supplémentaire de 27 aa de l'isoforme de grande taille de MSR semblait être une séquence d'adressage mitochondrial (Leclerc et al, 1998 ; Leclerc et al, 1999). La localisation mitochondriale de la protéine MSR a aussi été suggérée par Leal et al qui ont montré *in vitro* que MSR peut agir en tant que réductase en combinaison avec la protéine mitochondriale MMAB pour générer l'AdoCbl (Leal et al, 2004). Pour tester ces prédictions, Froese et al ont testé directement la distribution intracellulaire de MSR, par western blot, des extraits cytoplasmiques et mitochondriaux des fibroblastes humains et des cellules hépatocarcinomique Huh-1. Leurs travaux ont montré que MSR est détectée exclusivement dans le cytoplasme et non pas dans la mitochondrie. A cause de l'absence de l'acidurie méthylmalonique chez les cblE, Froese et al ont aussi suggéré que MSR ne fonctionne pas comme une réductase mitochondriale (Froese et al, 2008). D'après notre étude réalisée seulement sur les extraits cytoplasmiques et nucléaires et non mitochondriaux, nous n'avons pas seulement montré que MSR est une protéine cytoplasmique mais aussi que cette protéine n'est pas localisée dans le compartiment nucléaire des cellules. Des études supplémentaires doivent être faites pour tester la localisation mitochondriale de MSR.

D'après la littérature, la protéine MMACHC est localisée dans le cytoplasme. En se

basant sur la présentation phénotypique et la localisation subcellulaire connue de MS et de MCM, il a été suggéré que MMACHC fonctionne comme étant une protéine cytoplasmique (Stucki et al, 2012). Malgré cela, des données récentes issues du compendium (ou corpus) appelé Mitocarta ont suggéré que MMACHC pourrait être localisée dans la mitochondrie (Pagliarini et al, 2008). Cependant, Mah et al ont montré par fractionnement intracellulaire et immunofluorescence, effectuées sur des fibroblastes contrôles humains, que MMACHC est une protéine cytoplasmique et que MMADHC est cytoplasmique et mitochondriale (Mah et al, 2012). Cependant, nos résultats d'immunofluorescence et de western blot effectués sur les fractions cytoplasmiques et nucléaires des cellules HepG2 ont détecté pour la première fois une localisation nucléaire et cytoplasmique de cette protéine.

La protéine MMADHC possède un signal de localisation mitochondrial dans son extrémité N-terminale (Coelho et al, 2008). Les mécanismes responsables de la double localisation de MMADHC, cytoplasmique et mitochondriale, ont ensuite été étudiés plus en détails (Stucki et al, 2012). Deme et al ont étudié aussi la localisation de MMADHC en utilisant les techniques d'immunofluorescence et de fractionnement subcellulaire. Leurs résultats ont confirmé les travaux antérieurs concernant la double localisation de MMADHC. D'après notre travail sur le fractionnement nucléaire et cytoplasmique, nous n'avons détecté MMADHC que dans le compartiment cytoplasmique.

Classiquement, les MATs ont été considérés comme étant des protéines cytoplasmiques (Pajares et al, 1992). Or en 2009, les travaux de Reytor et al ont pu démontrer que les produits du gène *MAT1A* (MAT I et MAT III) sont aussi localisés dans le compartiment nucléaire. Nos résultats de western blot qui ont montré une double localisation nucléaire et cytoplasmique des produits de *MAT1A* sont en accord avec les données de Reytor et al. La présence des produits de *MAT1A* dans le noyau a permis d'émettre deux hypothèses concernant la synthèse de SAM. La première suggère que la SAM est synthétisée dans le cytoplasme par MAT I et MAT III et transportée dans le noyau pour être utilisée comme métabolite dans les réactions de méthylation des composants nucléaires tels que l'ADN et les histones (Reytor et al, 2009 ; Pajares et al, 2013). La seconde hypothèse suggère que

les isoformes de *MAT1A* sont transloquées vers le noyau où la SAM serait synthétisé *in situ* pour son utilisation dans les réactions de méthylation.

En 2011, Katoh et al ont découvert que MATIII α , codée par le gène *MAT2A* est également située dans la fraction nucléaire mais dans des proportions plus faibles que dans le cytoplasme (Kera et al, 2013 ; Pajares, 2016). Ces travaux ont été réalisés sur des fibroblastes humaines GM02063 fabriqués en 2007 par le groupe de Tsuyoshi et al. Les résultats de nos westerns blots sur les lysats cytoplasmiques et nucléaires ont montré que MATIII α est localisée majoritairement dans le cytoplasme et aussi en faible quantité dans le noyau, et confirment donc les publications de Katoh et al et de Pajares et al.

Nous avons montré que la sous-unité catalytique MAT β de la protéine MATII codée par le gène *MAT2B* est présente exclusivement dans le cytoplasme. Or, selon la littérature, les deux variantes V1 et V2 de la protéine MAT β sont localisées principalement dans le compartiment nucléaire et faiblement dans le cytoplasme des cellules HepG2 et RKO (Xia et al, 2010 ; Lu et al, 2012). Ces résultats contradictoires peuvent être dus à des différences dans les conditions de manipulations.

V. Identification de l'interaction potentielle entre la protéine MS et les trois isoformes de MAT

Le résultat le plus frappant dans notre étude est la découverte d'une interaction entre MS et les isoenzymes de MAT.

Notre hypothèse de départ repose sur l'observation selon laquelle les animaux et les cellules de notre laboratoire ayant des troubles dans le métabolisme cellulaire de la vitamine B12 avaient un faible rapport de SAM/SAH malgré la présence de méthionine dans leurs sources nutritionnelles. L'une des hypothèses qui ont été émises pour expliquer cette observation est que la MAT utiliserait uniquement ou préférentiellement la méthionine formée par la MS. Ceci pourrait s'expliquer par l'existence d'une interaction entre MS et les isoformes de MAT. Pour tester cette hypothèse, nous avons effectué une série de co-immunoprécipitation et de DuoLink sur des cellules HepG2 contrôles et sur des cellules HepG2 transfectées par un siARN dirigé contre *MTR* (Figure

29). Nos résultats sur les HepG2 contrôles ont montré une interaction entre MS et les isoformes de MAT alors qu'une diminution du signal de ces interactions a été remarquée après le Knock-down de *MTR*. Ces résultats confirment alors notre hypothèse de départ. D'après la littérature, il a été démontré que les isoformes de MAT peuvent interagir avec plusieurs protéines. Les deux isoformes de MAT2 β V1 et MAT2 β V2 interagissent avec MAT2 α en formant deux complexes : MAT α 2 β V1 et MAT α 2 β V2 (Yang et al, 2008). Il a été également démontré que les deux variants de MAT β interagissent avec HuR et SIRT1 (Yang et al, 2013). Gonzalez et al ont remarqué que les niveaux du produit de MS, la méthionine, régularisent l'expression des gènes de *MAT* (Gonzalez et al, 2013). Cette corrélation entre le produit de la MS et les gènes de *MAT* pourrait être le résultat d'une interaction directe entre MS et les isoformes de MAT. Sur la base de ces données bibliographiques et de nos résultats antérieurs, nous pourrions suggérer l'existence d'un complexe multiprotéique entre MS, MSR, les MAT et peut être Hur et/ou SIRT1. Il serait alors important de tester cette hypothèse ultérieurement.

VI. Localisation intracellulaire des interactions entre MS/MAT1A, MS/MAT2A, MS/MAT2B, MS/MSR et MS/MMACHC

L'existence d'un mécanisme de « channeling » de la voie métabolique de folates a été déjà démontrée dans la littérature (Scotti et al, 2013). Le métabolisme intracellulaire des folates partage plusieurs similitudes avec celui de la vitamine B12. Tout d'abord, les folates et les cobalamines sont extrêmement sensibles aux réactions d'oxydation. Ensuite, la majorité du temps, ces cofacteurs enzymatiques sont associés à des protéines enzymatiques ou de transport. De plus, plusieurs enzymes qui dépendent des cofacteurs de folate ou de la cobalamine possèdent des sites actifs capables de lier différents substrats (Schirch et al, 1989 ; Suh et al, 2010 ; Stover et al, 2011). Ces similitudes remarquables nous amènent à l'hypothèse d'un channeling (tunneling) du métabolisme de la cobalamine impliquant ainsi les enzymes (MS, MSR, MMACHC, MMADHC et les isoenzymes de MAT) et les cofacteurs de la vitamine b12.

Nous avons également émis une hypothèse selon laquelle MAT1A, qui est la seule protéine connue de l'interactome de la MS pour avoir une localisation nucléaire, pourrait être responsable de la translocation des protéines de ce complexe vers le compartiment nucléaire. Pour tester cette hypothèse, nous avons alors effectué une série d'expériences de Duolink sur des cellules HepG2 transfectées par un siARN contre *MAT1A* pour déterminer la localisation des interactions entre MS/MSR, MS/MMACHC et entre la MS et les isoformes de MAT (Figure 30). La localisation de ces interactions n'a pas changée. Alors, ces résultats montrent que les protéines codées par le gène *MAT1A* ne sont pas nécessaires à la localisation nucléaire de la MS.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVE

Le travail que j'ai réalisé au cours de mon projet de thèse s'inscrit dans le cadre des travaux visant à mieux comprendre la complexité des mécanismes moléculaires mis en jeu dans l'assimilation et l'utilisation de la cobalamine par les cellules. L'objectif principal de ce travail consistait à identifier et à caractériser l'interactome de la méthionine synthase. Le travail expérimental a été effectué à l'aide de fibroblastes de patients affectés par différents défauts génétiques du métabolisme de la Cbl; cblG, cblG-variant, cblD, cblC et cblE, et sur la lignée cellulaire HepG2.

L'ensemble de mes travaux a mis en évidence de nouvelles interactions entre différentes protéines impliquées dans le métabolisme de la Cbl. Il suggère également que les étapes cytoplasmiques du métabolisme de la Cbl, transport, protection, déalkylation ou décyantion, synthèse de méthionine et de SAM, seraient réalisées dans un complexe multiprotéique composé d'au moins de MS, MSR, MMACHC et de MMADHC. Cet interactome de la MS pourrait contribuer à protéger la Cbl du milieu cytoplasmique et à optimiser les différentes étapes enzymatiques par un mécanisme de « substrate chaneling ». Nos données suggèrent que des défauts d'interactions entre les principales protéines de la voie intracellulaire de la Cbl pourraient contribuer aux mécanismes moléculaires à l'origine des pathologies rencontrés chez les patients ayant les défauts génétiques cblC, cblE, cblD et cblG. Ces résultats font l'objet d'une publication soumise à « BBA Molecular Basis of Disease » et actuellement en cours de révision.

Un autre aspect de mes résultats suggère que MS, MSR et MMACHC sont également présentes dans le noyau et interagissent avec les isoformes de MAT. Cet interactome nucléaire de la MS pourrait être différent du complexe cytoplasmique et suggère que le mécanisme de « substrate chaneling » pourrait également s'étendre à la synthèse de SAM impliquée dans les mécanismes de méthylation, de l'ADN et de certaines protéines nucléaires. Dans ce cas, la synthèse de méthionine devrait être considérée comme un intermédiaire de tout un processus visant à la formation in situ de la SAM. Ces données permettraient d'expliquer pourquoi le ratio de SAM/SAH est affecté en cas de dysfonctionnement du métabolisme de la Cbl alors que la méthionine est disponible dans

le milieu cellulaire. Un deuxième article sera prochainement en préparation.

Il serait important de mettre en évidence de façon directe, l'existence de ce(s) complexe(s) multiprotéique(s) au sein de la cellule ou *in vitro*. Une collaboration avec Wyatt Yue du « Structural Genomics Consortium » de l'Université d'Oxford est en cours et contribuerait à avancer vers cet objectif. Il conviendrait aussi d'identifier de nouveaux partenaires protéiques de MS. L'existence d'autres partenaires protéiques de la MS sera étudiée par analyse protéomique (spectroscopie de masse après immunoprécipitation des extraits cellulaires à l'aide d'un anticorps ciblé contre MS). Un autre aspect à approfondir serait d'étudier les domaines de liaison impliqués dans ces différentes interactions et de caractériser les effets des mutations présentes chez les patients sur ces interactions.

Nos résultats apportent de nouvelles données qui permettent une meilleure compréhension de la physiopathologie de ces maladies rares du métabolisme de la cobalamine. La poursuite de ce projet permettra de mieux comprendre le rôle de la méthionine synthase, et en particulier les conséquences des mutations génétiques présentes chez les patients, dans la régulation du métabolisme de la vitamine B12. Ce travail de thèse s'inscrit dans un projet plus global centré sur l'étude des maladies rares du métabolisme de la vitamine B12 qui vise non seulement à caractériser les mécanismes moléculaires à l'origine des pathologies rencontrées chez les patients atteints par ces maladies rares du métabolisme de la B12 mais également à identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pour lesquelles des traitements innovants pourraient être développés.

RÉFÉRENCES

- Andersen CB, Madsen M, Storm T, Moestrup SK, Andersen GR. Structural basis for receptor recognition of vitamin b (12) intrinsic factor complex. *Nature*. 2010. 464(7287):445-8.
- Andrès E, Loukili NH, Noel E, Kaltenbach G, Abdelgheni MB, Perrin AE et al. Vitamin B12 (cobalamin) deficiency in elderly patients. 2004. *CMAJ*. 171(3): 251-259.
- Avila MA1, Berasain C, Torres L, Martín-Duce A, Corrales FJ, Yang H, Preto J et al. Reduced mRNA abundance of the main enzymes involved in methionine metabolism in human liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*. 2000. 33(6):907-14.
- Banerjee R, Gherasim C, Padovani D. The tinker, tailor, soldier in intracellular B12 trafficking. *Current opinion in chemical biology*. 2009. 13: 484-491
- Banerjee RV, Harder SR, Ragsdale SW, Matthews RG. Mechanism of reductive activation of cobalamin-dependent methionine synthase : an electron paramagnetic resonance spectroelectrochemical study. *Biochemistry*. 1990. 29(5):1129-35.
- Banerjee RV, Johnston NL, Sobeski JK, Datta P, Matthews RG. 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. *J Biol Chem*. 1989. 264(23):13888-95.
- Banerjee, R. B12 trafficking in mammals: A for coenzyme escort service. *ACS Chem Biol*. 2006. 1(3):149-59
- Bartakke S, Saindane A, Udgirkar V, Shrividya S, Bhavani GS, Girisha KM. Novel Mutation in an Indian Patient with Transcobalamin II Deficiency. *Indian J Pediatr*. 2015. 82(11):1073-4.
- Beedholm-Ebsen R, van de Wetering K, Hardlei T, Nexø E, Borst P, Moestrup SK. Identification of multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1) as a molecular gate for cellular export of cobalamin. *Blood*. 2010. 115(8):1632-9
- Blair JA, Johnson IT, Matty AJ. Absorption of folic acid by everted segments of rat jejunum. *J Physiol*. 1974. 236(3): 653–661.

- Bostom AG, Lathrop L. Hyperhomocysteinemia in end-stage renal disease: prevalence, etiology, and potential relationship to arteriosclerotic outcomes. *Kidney Int.* 1997. 52(1):10-20.
- Bottiglieri T. Homocysteine and folate metabolism in depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2005. 29(7):1103-12.
- Brito A, Mujica-Coopman MF, López de Romaña D, Cori H, Allen LH. Folate and Vitamin B12 Status in Latin America and the Caribbean: An Update. *Food Nutr Bull.* 2015. 36(2 Suppl):S109-18.
- Cai J, Sun WM, Hwang JJ, Stain SC, Lu SC. Changes in S-adenosylmethionine synthetase in human liver cancer: molecular characterization and significance. *Hepatology.* 1996. 24(5):1090-7.
- Carmel R, Parker J, Kelman Z. Genomic mutations associated with mild and severe deficiencies of transcobalamin I (haptocorrin) that cause mildly and severely low serum cobalamin levels. *Br J Haematol.* 2009. 147(3):386-91
- Carmel R. Mild transcobalamin I (haptocorrin) deficiency and low serum cobalamin concentrations. *Clin Chem.* 2003. 49(8):1367-74.
- Carreras CW, Santi DV. The catalytic mechanism and structure of thymidylate synthase. *Annu Rev Biochem.* 1995. 64:721-62.
- Coelho D, Suormala T, Stucki M, Lerner-Ellis JP, Rosenblatt DS, Newbold RF et al. Gene identification for the cblD defect of vitamin B12 metabolism. *The New England journal of medicine.* 2008. 358: 1454-1464.
- Combs GF. *The vitamins: Fundamental aspects in nutrition and health.* 2nd ed. Academic Press, San Diego, CA. 1998
- Czeizel AE, Dudas I. Prevention of the first occurrence of neural tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *N Engl J Med.* 1992. 327(26): 1832-5.
- Day D. Some Chemical Aspects of Calcium Deficiency Effects on *Pisum Sativum*. *Plant physiol.* 1935. 10: 811-816
- De Bree A, Vershuren M, Blom HJ, Kromhout D. Association between B vitamins intake and plasma homocysteine concentration in the general Dutch population aged 20-65y. *Am J Clin Nutr.* 2001. 73:1027-33.
- Deme JC, Miousse IR, Plesa M, Kim JC, Hancock MA, Mah W et al. Structural

features of recombinant MMADHC isoforms and their interactions with MMACHC, proteins of mammalian vitamin B12 metabolism. *Mol. Mol Genet Metab.* 2012 Nov;107(3):352-62.

- De-Regil LM, Fernandez-Gaxiola AC, Dowswell T, Pena-Rosas JP. Effects and safety of periconceptional folate supplementation for preventing birth defects. *Cochrane Database Syst Rev.* 2010. (10): CD007950.
- Dixon MM, Huang S, Matthews RG, Ludwig M. The structure of the C-terminal domain of methionine synthase: presenting S-adenosylmethionine for reductive methylation of B12. *Structure.* 1996. 4(11):1263-75.
- Dobson CM, Wai T, Leclerc D, Kadir H, Narang M, Lerner-Ellis JP et al. Identification of the gene responsible for the cblB complementation group of vitamin B12-dependent methylmalonic aciduria. *Hum Mol Genet.* 2002. 15;11(26):3361-9.
- Drennan CL, Huang S, Drummond JT, Matthews RG, Lidwig ML. How a protein binds B12: A 3.0 Å X-ray structure of B12-binding domains of methionine synthase. *Science.* 1994. 266(5191):1669-74.
- Dringen R, Hamprecht B. N-acetylcysteine, but not methionine or 2-oxothiazolidine-4-carboxylate, serves as cysteine donor for the synthesis of glutathione in cultured neurons derived from embryonal rat brain. *Neurosci Lett.* 1999. 259(2):79-82.
- Drummond JT, Huang S, Blumenthal RM, Matthews RG. Assignment of enzymic function to specific regions of cobalamin-dependent methionine synthase from *Escherichia coli*. *Biochemistry.* 1993. 32(36):9290-5
- Duan W1, Ladenheim B, Cutler RG, Kruman II, Cadet JL, Mattson MP. Dietary folate deficiency and elevated homocysteine levels endanger dopaminergic neurons in models of Parkinson's disease. *J Neurochem.* 2002. 80(1): 101-10.
- Evans JC, Huddler DP, Hilgers MT, Romanchuk G, Matthews RG, Ludwig ML. Structures of the N-terminal modules imply large domain motions during catalysis by methionine synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004. 101(11):3729-36.
- Evans JC, Huddler DP, Hilgers MT, Romanchuk G, Matthews RG, Ludwig ML.. Structures of then terminal modules imply large domain motions during catalysis

- by methionine synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004. 101(11): 3729-36.
- Faeh D, Chiolero A, Paccaud F. Homocysteine as a risk factor for cardiovascular disease: should we (still) worry about it? *Swiss Med Wkly* 2006. 136:745-56.
 - Fedosov SN. Physiological and molecular aspects of cobalamin transport. *Subcell Biochem*. 2012. 56:347-67.
 - Ferrand A, Siu VM, Rupar CA, Napier MP, Al-Dirbashi OY, Chakraborty P et al. Biochemical and Hematologic Manifestations of Gastric Intrinsic Factor (GIF) Deficiency: A Treatable Cause of B12 Deficiency in the Old Order Mennonite Population of Southwestern Ontario. *JIMD Rep*. 2015. 18:69-77.
 - 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 anemia. *Hum Mol Genet*. 2013. 22(22):4591-601.
 - Foster MA, Dilworth MJ, Woods DD. Cobalamin and the synthesis of methionine by *Escherichia coli*. *Nature*. 1964 Jan 4; 201:39-42.
 - Fowler B, Schutgens RBH, Rosenblatt DS, Smit GPA, Lindemans J. Folate-responsive homocystinuria and megaloblastic anaemia in a female patient with functional methionine synthase deficiency (cblE disease). *J Inher Metab Dis*. 1997. 20:731-741.
 - Fowler B. Genetic defects of folate and cobalamin metabolism. *Eur J Pediatr*. 1998. 57 Suppl 2:S60-6.
 - Franken DG, Blom HJ, Boers GH, Tangerman A, Thomas CM, Trijbels FJ. Thiamine (vitamin B1) supplementation does not reduce fasting blood homocysteine concentration in most homozygotes for homocystinuria. *Biochim Biophys Acta*. 1996. 1317(2):101-4.
 - Froese DS, Kochan G, Muniz JR, Wu X, Gileadi C, Ugochukwu E. Structures of the human GTPase MMAA and vitamin B12-dependent methylmalonyl-CoA mutase and insight into their complex formation. *J Biol Chem*. 2010. 285(49):38204-13.
 - Froese DS, Kopec J, Fitzpatrick F, Schuller M, McCorvie TJ, Chalk R. Structural Insights into the MMACHC-MMADHC Protein Complex Involved in Vitamin

B12 Trafficking. *J Biol Chem*. 2015. 290(49):29167-77

- Froese DS, Zhang J, Healy S, Gravel RA. Mechanism of vitamin B12-responsiveness in cblC methylmalonic aciduria with homocystinuria. *Mol Genet Metab*. 2009. 98(4):338-43.
- Fyfe JC, Madsen M, Højrup P, Christensen EI, Tanner SM, de la Chapelle A et al. The functional cobalamin (vitamin B12)-intrinsic factor receptor is a novel complex of cubilin and amnionless. *Blood*. 2004. 103(5):1573-9.
- Ganesan T, Khadra MH, Wallis J, Neal DE. Vitamin B12 malabsorption following bladder reconstruction or diversion with bowel segments. *ANZ J Surg*. 2002. 72(7): 479-482.
- Gerhard GT, Duell PB. Homocysteine and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*. 1999. 10(5): 417-28.
- Gherasim CG, Zaman U, Raza A, Banerjee R. Impeded electron transfer from a pathogenic FMN domain mutant of methionine synthase reductase and its responsiveness to flavin supplementation. *Biochemistry*. 2008. 47(47):12515-22
- Goulding CW, Postigo D, Matthews RG. Cobalamin-dependent methionine synthase is a modular protein with distinct regions for binding homocysteine, methyltetrahydrofolate, cobalamin, and adenosylmethionine. *Biochemistry*. 1997. 36(26):8082-91.
- Gräsbeck R, Gordin R, Kantero I, Kuhlback B. Selective Vitamin B₁₂ Malabsorption and Proteinuria in Young People A Syndrome Authors. *Acta Med Scand*. 1960. 67:289-96
- Gräsbeck R, Simons K, Sinkkonen I. Isolation of intrinsic factors from human gastric juice. 1965. *Acta Chem Scand*. 19(7): 1777-1778.
- Gregory JF. Case study: folate bioavailability. *J Nutr*. 2001. 131(4 Suppl): 1376S-82S.
- Guéant JL, Caillerez-Fofou M, Battaglia-Hsu S, Alberto JM, Freund JN, Dulluc I et al. Molecular and cellular effects of vitamin B12 in brain, myocardium. *Biochimie*. 2013. 95(5):1033-40. doi.
- Guéant JL, Namour F, Guéant-Rodriguez RM, Daval JL. Folate and fetal programming: a play in epigenomics? *Trends Endocrinol Metab*. 2013. 24(6):279-

- Guillard JC, Favier A, Potier de Courcy G, Galan P, Hercberg S. L'hyperhomocystéinémie : facteur de risque cardiovasculaire ou simple marqueur ? 1. Données fondamentales. *Pathologie Biologie*. 2003. 51:101-10.
- Gulati S, Baker P, Li YN, Fowler B, Kruger W, Brody LC et al. Defects in human methionine synthase in cblG patients. *Hum Mol Genet*. 1996. 5(12):1859-6
- Halsted CH1, Villanueva JA, Devlin AM, Niemelä O, Parkkila S, Garrow TA et al. Folate deficiency disturbs hepatic methionine metabolism and promotes liver injury in the ethanol-fed micropig. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 .99(15): 10072-7.
- Hannibal L1, Kim J, Brasch NE, Wang S, Rosenblatt DS, Banerjee R et al. Processing of alkylcobalamins in mammalian cells: A role for the MMACHC (cblC) gene product. 2009. *Mol Genet Metab*. 2009 Aug;97(4):260-6.
- Hannibal L1, Kim J, Brasch NE, Wang S, Rosenblatt DS, Banerjee R et al. Processing of alkylcobalamins in mammalian cells: A role for the MMACHC (cblC) gene product. *Mol Genet Metab*. 2009. 97(4):260-6.
- Harding CO, Arnold G, Barness LA, Wolff JA, Rosenblatt DS. Functional methionine synthase deficiency due to cblG disorder: areport of two patients and a review. *Am J Med Genetics*. 1997. 71:384–390.
- Herbert V. Experimental nutritional folate deficiency in man. *Trans Assoc Am Physicians*. 1962. 75:307-20.
- Herrmann W and Obeid R; Causes and Early Diagnosis of Vitamin B12 Deficiency. *Dtsch Arztebl Int*. 2008. 105(40): 680–685
- Herrmann W, Schorr H, Obeid R, Geisel J. Vitamin B-12 status, particulary holotranscobalamin II and methylmalonic acid concentrations, and hyperhomocysteinemia in vegetarians. *Am J Clin Nutr*. 2003. 78:131-6.
- Hodgkin, DC. Kamper J, Mackay M, Pickworth J, Trueblood KN, White JG. Structure of vitamin B12. *Nature*. 1956. 178 (4524): 64-66.
- Homolova K, Zavadakova P, Doktor TK, Schroeder LD, Kozich V, Andresen BS. The deep intronic c.903+469T>C mutation in the MTRR gene creates an SF2/ASF binding exonic splicing enhancer, which leads to pseudoexon activation

and causes the cblE type of homocystinuria. *Hum Mutat.* 2010. 31(4):437-44.

- Hummer M, Kožich V, Rinaldo P, Baumgartner MR, Merinero B et al. Newborn screening for homocystinurias and methylation disorders: systematic review and proposed guidelines. *J Inher Metab Dis.* 2015. 38(6): 1007–1019
- Janosík M, Oliveriusová J, Janosíková B, Sokolová J, Kraus E, Kraus JP et al. Impaired heme binding and aggregation of mutant cystathionine beta-synthase subunits in homocystinuria. *Am J Hum Genet.* 2001. 68(6): 1506-13.
- Jarrett JT, Amaratunga M, Drennan CL, Scholten JD, Sands RH, Ludwig ML et al. Mutations in the B12-binding region of methionine synthase: How the protein controls methylcobalamin reactivity. *Biochemistry.* 1996. 35(7):2464-75.
- Jolivet JI, Faucher F, Pinard MF. Influence of intracellular folates on methotrexate metabolism and cytotoxicity. *Biochem Pharmacol.* 1987. 36(19):3310-2.
- Kim J, Gherasim C, Banerjee R. Decyanation of vitamin B12 by a trafficking chaperone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2008. 105: 14551-14554
- Kim J, Hannibal L, Gherasim C, Jacobsen DW, Banerjee R. A human vitamin B12 trafficking protein uses glutathione transferase activity for processing alkylcobalamins. *J Biol Chem.* 2009. 284(48):33418-24.
- Kolhouse JF, Allen RH. Recognition of two intracellular cobalamin binding proteins and their identification as methylmalonyl-CoA mutase and methionine synthetase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977. 74(3):921-5.
- Kothekar MA. Homocysteine in cardiovascular disease: a culprit or an innocent bystander? *Indian J Med Sci.* 2007. 61(6):361-71.
- Koutmos M, Datta S, Patridge KA, Smith JL, Matthews RG. Insights into the reactivation of cobalamin-dependent methionine synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009. 106(44): 18527-32.
- Koutmos M, Gherasim C, Smith JL, Banerjee R. Structural basis of multifunctionality in a vitamin B12-processing enzyme. *J Biol Chem.* 2011. 286(34):29780-7.
- Kullo IJ, Ding K, Boerwinkle E, Turner ST, Mosley TH Jr, Karda SL et al. Novel

- genomic loci influencing plasma homocysteine levels. *Stroke*. 2006. 37(7):1703-9.
- Labrune P, Zittoun J, Duvaltier I, Trioche P, Marquet J, Niaudet P et al. Haemolytic uraemic syndrome and pulmonary hypertension in a patient with methionine synthase deficiency. *Eur J Pediatr*. 1999. 158(9):734-9.
 - Le Grusse J., Watier B. Les vitamines. Données biochimiques, nutritionnelles et cliniques. Centre d'Études et d'Information sur les Vitamines. 1993. Produits Roche, Neuilly sur Seine, France.
 - Leclerc D1, Wilson A, Dumas R, Gafuik C, Song D, Watkins D et al. Cloning and mapping of a cDNA for methionine synthase reductase, a flavoprotein defective in patients with homocystinuria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998. 95(6):3059-64.
 - Lee TD1, Sada MR, Mendler MH, Bottiglieri T, Kanel G, Mato JM et al. Abnormal hepatic methionine and glutathione metabolism in patients with alcoholic hepatitis. *Alcohol Clin Exp Res*. 2004. 28(1): 173-81.
 - Lerner-Ellis JP1, Tirone JC, Pawelek PD, Doré C, Atkinson JL, Watkins D et al. Identification of the gene responsible for methylmalonic aciduria and homocystinuria, cblC type. *Nat Genet*. 2006. 38(1):93-100.
 - Li YN, Gulati S, Baker PJ, Brody LC, Banerjee R, Kruger WD. Cloning, mapping and RNA analysis of the human methionine synthase gene. *Hum Mol Genet*. 1996. 5(12):1851-8.
 - Liu XX, Wilson K, Charlton CG. Effects of L-dopa treatment on methylation in mouse brain: implications for the side effects of L-dopa. *Life Sci*. 2000. 66(23): 2277-88.
 - Lu SC, Huang ZZ, Yang H, Mato JM, Avila MA, Tsukamoto H. Changes in methionine adenosyltransferase and S-adenosylmethionine homeostasis in alcoholic rat liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2000. 279(1):G178-85.
 - Luck M. Folic acid: nutritional biochemistry, molecular biology, and role in disease processes. *Mol Genet Metab*. 2000. 71(1-2):121-38.
 - Ludwig ML, Matthews RG. Structure-based perspectives on B12-dependent

enzymes. *Annu Rev Biochem.* 1997. 66:269-313.

- Martínez-Chantar ML, Latasa MU, Varela-Rey M, Lu SC, García-Trevijano ER, Mato JM. L-Methionine availability regulates expression of the methionine adenosyltransferase 2A gene in human hepatocarcinoma cells. *J Biol Chem.* 2003. 278(22): 19885-90.
- Masalha R, Rudoy I, Volkov I, Yusuf N, Wirguin I, Herishanu YO. Symptomatic dietary vitamin B(12) deficiency in a nonvegetarian population. *Am J Med.* 2002. 112(5):413-6
- Massey V, Hemmerich P. Active-site probes of flavoproteins. *Biochem Soc Trans.* 1980. 8(3):246-57.
- Matherly LH, Goldman DI. Membrane transport of folates. *Vitam Horm.* 2003. 66:403-56.
- Mato JM, Lu SC. Role of S-adenosyl-L-methionine in liver health and injury. *Hepatology.* 2007. 45(5):1306-12.
- Matthews RG, Ross J, Baugh CM, Cook JD, Davis L. Interactions of pig liver serine hydroxymethyltransferase with methyltetrahydropteroylpolyglutamate inhibitors and with tetrahydropteroylpolyglutamate substrates. *Biochemistry.* 1982. 21(6): 1230-8.
- McDowell, LR. *Vitamins in Animal Nutrition: Comparative Aspects to Human Nutrition.* Academic Press, San Diego, California. 2000.
- Melse-Boonstra A, Holm PI, Ueland PM, Olthof M, Clarke R, Verhoef P. Betaine concentration as a determinant of fasting total homocysteine concentrations and the effect of folic acid supplementation on betaine concentrations. *Am J Clin Nutr.* 2005. 81(6): 1378-82.
- Mitchell HK, Snell EE, Williams RJ. *Journal of the American Chemical Society*, Vol. 63, 1941: The concentration of "folic acid" by Herschel K. Mitchell, Esmond E. Snell, and Roger J. Williams. *Nutr Rev.* 1988. 46(9):324-5
- Molina V1, Medici M, Taranto MP, Font de Valdez G. Effects of maternal vitamin B12 deficiency from end of gestation to weaning on the growth

and haematological and immunological parameters in mouse dams and offspring. *Arch Anim Nutr.* 2008. 62(2):162-8.

- Morell C, Rosenblatt D. Inborn Errors of Folate and Cobalamin Transport and Metabolism. *Pediatric Endocrinology and Inborn Errors of Metabolism.* 2010.
- Müller P, Horneff G, Hennermann JB. A rare inborn error of intracellular processing of cobalamin presenting with microcephalus and megaloblastic anemia: a report of 3 children. *Klin Padiatr.* 2007. 219(6):361-7.
- Muratore CR, Hodgson NW, Trivedi MS, Abdolmaleky HM, Persico AM, Lintas C et al. Age-Dependent Decrease and Alternative Splicing of Methionine Synthase mRNA in Human Cerebral Cortex and an Accelerated Decrease in Autism. *PLoS One.* 2013. 8(2):e56927
- Namour F, Dobrovoljski G, Chery C, Audonnet S, Feillet F, Sperl W et al. Luminal expression of cubilin is impaired in Imerslund-Grasbeck syndrome with compound AMN mutations in intron 3 and exon 7. *Haematologica.* 2011. 96(11):1715-9.
- Namour F, Helfer AC, Quadros EV, Alberto JM, Bibi HM, Orning L. Transcobalamin deficiency due to activation of an intra exonic cryptic splice site. *Br J Haematol.* 2003. 123(5):915-20.
- Nicolas, JP, Gueant JL. Absorption, distribution and excretion of vitamin B12. *Ann Gastroenterol Hepatol.* 1994. 30(6): 270-276, 281; discussion 281-272.
- Nielsen MJ, Rasmussen MR, Andersen CB, Nexø E, Moestrup SK. Vitamin B12 transport from food to the body's cells--a sophisticated, multistep pathway. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology.* 2012. 9: 345-354
- Norlund L, Grubb A, Fex G, Leksell H, Nilsson JE, Schenck H et al. The increase of plasma homocysteine concentrations with age is partly due to the deterioration of renal function as determined by plasma cystatin C. *Clin Chem Lab Med.* 1998. 36(3):175-8.
- Ohrvik VE, Witthoft CM. Human folate bioavailability. *Nutrients.* 2011. 3(4):475-90
- Olteanu H, Banerjee R. Human methionine synthase reductase, a soluble P-450 reductase-like dual flavoprotein, is sufficient for NADPH-dependent methionine

- synthase activation. *J Biol Chem*. 2001. 276(38):35558-63.
- Outteryck O, de Sèze J, Stojkovic T, Cuisset JM, Dobbelaere D, Delalande S et al. Methionine synthase deficiency: a rare cause of adult-onset leukoencephalopathy. *Neurology*. 2012. 79(4):386-8.
 - Padovani D, Banerjee R. A rotary mechanism for coenzyme B(12) synthesis by adenosyltransferase. *Biochemistry*. 2009. 48(23):5350-7.
 - Pagliarini DJ1, Calvo SE, Chang B, Sheth SA, Vafai SB, Ong SE et al. A mitochondrial protein compendium elucidates complex I disease biology. *Cell*. 2008. 134(1):112-23.
 - Palanca D, Garcia-Cazorla A, Ortiz J, Jou C, Cusí V, Suñol M et al. CblE-type homocystinuria presenting with features of haemolytic-uremic syndrome in the newborn period. *JIMD Rep*. 2013;8:57-62.
 - Parker N, Turk MJ, Westrick E, Lewis JD, Low PS, Leamon CP. Folate receptor expression in carcinomas and normal tissues determined by a quantitative radioligand binding assay. *Anal Biochem*. 2005. 338(2):284-93.
 - Pedersen GA1, Chakraborty S, Steinhauser AL, Traub LM, Madsen M. AMN directs endocytosis of the intrinsic factor-vitamin B(12) receptor cubam by engaging ARH or Dab2. *Traffic*. 2010 May;11(5):706-20
 - Plesa M, Kim J, Paquette SG, Gagnon H, Ng-Thow-Hing C, Gibbs BF et al. Interaction between MMACHC and MMADHC, two human proteins participating in intracellular vitamin B12 metabolism. *Mol Genet Metab*. 2011. 102(2):139-48.
 - Poloschek CM1, Fowler B, Unsold R, Lorenz B. Disturbed visual system function in methionine synthase deficiency. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2005. 243(5):497-500
 - Qiu A, Jansen M, Sakaris A, Min SH, Chattopadhyay S, Tsar E et al. Identification of an intestinal folate transporter and the molecular basis for hereditary folate malabsorption. *Cell*. 2006. 127(5):917-28.
 - Quadros EV, Lai SC, Nakayama Y, Sequeira JM, Hannibal L, Wang S et al. Positive newborn screen for methylmalonic aciduria identifies the first mutation in TCbIR/CD320, the gene for cellular uptake of transcobalamin-bound vitamin B12.

Hum Mutat. 2010. 31(8):924-9.

- Quadros EV, Nakayama Y, Sequeira JM. Saporin Conjugated Monoclonal Antibody to the Transcobalamin Receptor TCbIR/CD320 Is Effective in Targeting and Destroying Cancer Cells. *J Cancer Ther.* 2013. 4(6):1074-1081.
- Quadros EV, Nakayama Y, Sequeira JM. The protein and the gene encoding the receptor for the cellular uptake of transcobalamin-bound cobalamin. *Blood.* 2009. 113(1):186-92.
- Quadros EV, Sequeira JM. Cellular uptake of cobalamin: transcobalamin and the TCbIR/CD320 receptor. *Biochimie.* 2013 May;95(5):1008-18
- Rébeillé F, Ravanel S, Jabrin S, Douce R, Storozhenko S, Van Der Straeten D. Folates in plants: Biosynthesis, distribution, and enhancement. *Physiol Plant.* 2006. 126(3):330 - 342
- Refsum H, Ueland PM, Nygard O, Vollset SE. Homocysteine and cardiovascular disease. *Annu Rev Med.* 1998. 49:31–62.
- Regec A, Quadros EV, Platica O, Rothenberg SP. The cloning and characterization of the human transcobalamin II gene. *Blood.* 1995. 85(10):2711-9.
- Richard E, Desviat LR, Ugarte M, Pérez B. Oxidative stress and apoptosis in homocystinuria patients with genetic remethylation defects. *J Cell Biochem.* 2013. 114(1):183-91
- Ricketts EL, Brink NG, Koniuszy FR, Wood TR, Folkers K. Crystalline Vitamin B12. *Science.* 1948. 107 (2781):396-397.
- Roblin X, Phelip JM, Genevois M, Ducros V, Bonaz B. Hyperhomocysteinaemia is associated with osteoporosis in patients with Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2007. 25(7): 797-804.
- Rosenblatt DS, Cooper BA. Inherited disorders of vitamin B12 metabolism. *Blood Rev.* 1987. 1(3):177-82.
- Rosenblatt DS, Fenton WA. Inherited disorders of folate and cobalamin transport and metabolism. *The Metabolic & Molecular Basis of Inherited Disease.* 8th ed. New York: McGraw-Hill; 2001:3897–3933.
- Rosenblatt DS, Fowler B. Disorders of cobalamin and folate transport and

metabolism. In: Fernandez J, Saudubray J-M, van den Berghe B, eds. *Inborn Metabolic Diseases: Diagnosis and Treatment*. 4th ed. Berlin: Springer; 2006:343–351.

- Ruiz-Mercado M, Vargas MT, de Soto IP, Pecellín CD, Sánchez MC, Delgado MA et al. Methionine synthase reductase deficiency (CblE): A report of two patients and a novel mutation. *Hematology*. 2016. 21(3):193-7.
- Russell-Jones, GJ. et Alpers DH. Vitamin B12 transporters. *Pharm Biotechnol*. 1999. 12:493-520.
- Rutsch F1, Gailus S, Miousse IR, Suormala T, Sagné C, Toliat MR, "Identification of a putative lysosomal cobalamin exporter altered in the cblF defect of vitamin B12 metabolism." *Nat Genet*. 2009. 41(2): 234-239.
- Salazar MD, Ratnam M. The folate receptor: what does it promise in tissue-targeted therapeutics? *Cancer Metastasis Rev*. 2007. 26(1):141-52.
- Schuh S, Rosenblatt DS, Cooper BA, Schroeder ML, Bishop AJ, Seargeant LE, Haworth JC. Homocystinuria and megaloblastic anemia responsive to vitamin B-12 therapy. *New Engl J Med*. 1984. 310:686–690.
- Scott JM. Folate and vitamin B12. *The Proceedings of the Nutrition Society*. 1999. 58: 441-448
- Seetharam B, Bose S, Li N. Cellular import of cobalamin (Vitamin B-12). *The Journal of nutrition*. 1999. 129: 1761-1764
- Seetharam B, Li N. Transcobalamin II and its cell surface receptor. *Vitamins and Hormones*. 2000. 59: 337-366
- Selhub J. Homocysteine metabolism. *Annu Rev Nutr*. 1999; 19:217-46.
- Seligman PA, Steiner LL, Allen RH. Studies of a patient with megaloblastic anemia and an abnormal transcobalamin II. *N Engl J Med*. 1980. 303(21):1209-12.
- Shane B, Stokstad EL. Vitamin B12-folate interrelationships. *Annu Rev Nutr*. 1985. 5:115-41.
- Sharma P1, Senthilkumar RD, Brahmachari V, Sundaramoorthy E, Mahajan A, Sharma A. Mining literature for a comprehensive pathway analysis: a case study for retrieval of homocysteine related genes for genetic and epigenetic studies.

Lipids Health Dis. 2006. 5; el.

- Shaw GM, Jensvold, NG, Wasserman CR, Lammer EJ. Epidemiologic characteristics of phenotypically distinct neural tube defects among 0.7 million California births, 1983-1987. *Teratology*. 1994. 49(2): 143-9.
- Shivapurkar N, Poirier LA. Tissue levels of S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine in rats fed methyl-deficient, amino acid-defined diets for one to five weeks. *Carcinogenesis*. 1983. 4(8): 1051-7.
- Shojania AM, Hornady G, Barnes PH. Oral contraceptives and serum-folate level. *Lancet*. 1968. 1(7556): 1376-7.
- Shows TB, Alders M, Bennett S, Burbee D, Cartwright P, Chandrasekharappa et al. Report of the Fifth International Workshop on Human Chromosome 11 Mapping 1996. *Cytogenet Cell Genet*. 1996. 74(1-2):1-56.
- Sillaots SL, Hall CA, Hurteloup V, Rosenblatt DS. Heterogeneity in cblG: differential retention of cobalamin on methionine synthase. *Biochem Med Metab Biol*. 1992. 47(3):242-9.
- Smith, EL. Purification of anti-pernicious anaemia factors from liver. *Nature*. 1948. 161(4095): 638.
- Smithells, RW, Sheppard S, Schorah CJ. Vitamin deficiencies and neural tube defects. *Arch Dis Child*. 1976. 51(12): 944-50
- Smulders YM, Stehouwer CD. Folate metabolism and cardiovascular disease. *Semin Vasc Med*. 2005. 5(2): 87-97.
- Stanisławska-Sachadyn A, Woodside JV, Brown KS, Young IS, Murray L, McNulty H et al. Evidence for sex differences in the determinants of homocysteine concentration. *Mol Genet Metab*. 2008. 93(4): 355-62
- Stea TH, Johansson M, Jägerstad M, Frølich W. Retention of folates in cooked, stored and reheated peas, broccoli and potatoes for use in modern large scale service systems. *Food Chem*. 2007. 101(3), 1095–1107
- Stea TH, Mansoor MA, Wandel M, Uglem S, Frølich W. Changes in predictors and status of homocysteine in young male adults after a dietary intervention with vegetables, fruits and bread. *Eur J Nutr*. 2008. 47(4):201-9
- Steinberg SE. Mechanisms of folate homeostasis. *Am J Physiol*. 1984. 246(4 Pt

1):G319-24.

- Stucki M1, Coelho D, Suormala T, Burda P, Fowler B, Baumgartner MR. Molecular mechanisms leading to three different phenotypes in the cblD defect of intracellular cobalamin metabolism. *Hum Mol Genet* 2012. 21(6):1410-8.
- Tanner SM, Li Z, Perko JD, Oner C, Cetin M, Altay C et al. Hereditary juvenile cobalamin deficiency caused by mutations in the intrinsic factor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005. 102(11):4130-3
- Tchanchou F. Homocysteine metabolism and various consequences of folate deficiency. *J Alzheimers Dis*. 2006. 9(4):421-7.
- Trakadis YJ, Alfares A, Bodamer OA, Buyukavci M, Christodoulou J, Connor P et al. Update on transcobalamin deficiency: clinical presentation, treatment and outcome. *J Inherit Metab Dis*. 2014. 37(3):461-73.
- Trippett TM1, Garcia S, Manova K, Mody R, Cohen-Gould L, Flintoff W et al. Localization of a human reduced folate carrier protein in the mitochondrial as well as the cell membrane of leukemia cells. *Cancer Res*. 2001. 61(5):1941-7.
- Ubagai T1, Lei KJ, Huang S, Mudd SH, Levy HL, Chou JY. Molecular mechanisms of an inborn error of methionine pathway: methionine adenosyltransferase deficiency. *J Clin Invest*. 1995. 96(4):1943-7.
- Ubbink JB, Becker PJ, Vermaak WJ, Delport R. Results of B-vitamin supplementation study used in a prediction model to define a reference range for plasma homocysteine. *Clin Chem*. 1995. 41(7): 1033-7.
- Ueland, P. M., H. Refsum, Beresford SA, Vollset SE. The controversy over homocysteine and cardiovascular risk. *Am J Clin Nutr*. 2000. 72(2): 324-32.
- Ünal Ş, Rupa T, Yetgin S, Yaralı N, Dursun A, Gü sel T et al. Transcobalamin II Deficiency in Four Cases with Novel Mutations. *Turk J Haematol*. 2015. 32(4):317-22.
- Vesin C, Horellou M-H, Mairesse S, Conard J, Safar M, Blacher J. Homocystéine et risque cardiovasculaire. *Sang thrombose vaisseaux*. 2007. 19:143-9.
- Wang Y, Zhao R, Russell RG, Goldman ID. Localization of the murine reduced folate carrier as assessed by immunohistochemical analysis. *Biochim Biophys Acta*. 2001. 1513(1):49-54.

- Watkins D and Rosenblatt DS. Inborn errors of cobalamin absorption and metabolism. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2011. 157C(1):33-44.
- Watkins D, Rosenblatt DS. Failure of lysosomal release of vitamin B12: A new complementation group causing methylmalonic aciduria. *Am J Hum Genet.* 1986. 39(3):404-8.
- Watkins D, Rosenblatt DS. Lessons in biology from patients with inherited disorders of vitamin B12 and folate metabolism. *Biochimie.* 2016. 126:3-5.
- Weisberg I, Tran P, Christensen B, Sibani S, Rozen R. A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. *Mol Genet Metab.* 1998. 64(3):169-72.
- Werler, MM, Shapiro S, Mitchell AA. Periconceptional folic acid exposure and risk of occurrent neural tube defects. *AMA.* 1993. 269(10): 1257-61
- Wilson A, Leclerc D, Saberi F, Campeau E, Hwang HY, Shane B et al. Functionally null mutations in patients with the cblG-variant form of methionine synthase deficiency. *Am J Hum Genet.* 1998. 63(2):409-14.
- Wolthers KR, Basran J, Munro AW, Scrutton NS. Molecular dissection of human methionine synthase reductase: determination of the flavin redox potentials in full-length enzyme and isolated flavin-binding domains. *Biochemistry.* 2003. 42(13):3911-20.
- Wolthers KR, Scrutton NS. Protein interactions in the human methionine synthase-methionine synthase reductase complex and implications for the mechanism of enzyme reactivation. *Biochemistry.* 2007. 46(23):6696-709.
- Yamada K, Gravel RA, Toraya T, Matthews RG.. Human methionine synthase reductase is a molecular chaperone for human methionine synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006. 103(25):9476-81.
- Yassin F, Rothenberg SP, Rao S, Gordon MM, Alpers DH, Quadros EV. Identification of a 4-base deletion in the gene in inherited intrinsic factor deficiency. *Blood.* 2004. 103(4):1515-7.
- Zavadáková P, Fowler B, Suormala T, Novotna Z, Mueller P, Heinemann JB et al. cblE type of homocystinuria due to methionine synthase reductase deficiency: functional correction by minigene expression. *Hum Mutat.* 2005. 25(3):239-47.

- Zavadáková P, Fowler B, Suormala T, Novotna Z, Mueller P, Hennermann JB et al. cblE type of homocystinuria due to methionine synthase reductase deficiency: functional correction by minigene expression. *Hum Mut.* 2005. 25:239– 247.
- Zavadakova P1, Fowler B, Zeman J, Suormala T, Pristoupilová K, Kozich V et al. CblE type of homocystinuria due to methionine synthase reductase deficiency: clinical and molecular studies and prenatal diagnosis in two families. *J Inherit Metab Dis.* 2002 Oct;25(6):461-76.
- Zhao R, Matherly LH, Goldman ID. Membrane transporters and folate homeostasis: intestinal absorption and transport into systemic compartments and tissues. *Expert Rev Mol Med.* 2009. 11:e4
- Zhao R, Qiu A, Tsai E, Jansen M, Akabas MH, Goldman ID. The proton-coupled folate transporter: impact on pemetrexed transport and on antifolates activities compared with the reduced folate carrier. *Mol Pharmacol.* 2008. 74(3):854-62.

ARTICLE

Methionine synthase and methionine synthase reductase interact with MMACHC and with MMADHC

Christine Bassila^a, Rose Ghemrawi^a, Justine Flayac^a, D. Sean Froese^{b, c}, Matthias R. Baumgartner^{b, c}, Jean-Louis Guéant^a and David Coelho^a

^a UMR_S UL-Inserm U954 Nutrition-Genetics-Environmental Risk Exposure and Reference Centre of Inborn Metabolism Diseases, Medical Faculty of Nancy University and University Hospital Centre, Nancy, France

^b Division of Metabolism and Children's Research Center, University Children's Hospital, Zürich, Switzerland

^c radiz – Rare Disease Initiative Zürich, Clinical Research Priority Program for Rare Diseases, University of Zürich, Switzerland

E-mail addresses:

christine.bassila@univ-lorraine.fr, rose.ghemrawi@univ-lorraine.fr, justine.flayac@univ-lorraine.fr, sean.froese@kispi.uzh.ch, matthias.baumgartner@kispi.uzh.ch, jean-louis.gueant@univ-lorraine.fr, david.coelho@univ-lorraine.fr

Corresponding author at: Inserm U954, Faculté de Médecine, 9 avenue de la Forêt de haye, CS 50184, 54505 Vandoeuvre-les-Nancy Cedex, France.

E-mail address: david.coelho@univ-lorraine.fr (D.Coelho).

Keywords:

rare disease, vitamin B12, methionine synthase, methionine synthase reductase, MMACHC, MMADHC

Abstract

An increasing number of studies indicate that each step of the intracellular processing of vitamin B12 or cobalamin (Cbl) involve protein-protein interactions. We have previously described a novel interaction between methionine synthase (MS) and MMACHC and its effect on the regulation of MMACHC activity. Our goal is to further characterize the interactions of MS with other potential partners in a so-called MS interactome. We dissected the interactions and their alterations by co-immunoprecipitation and DuoLink proximity ligation assays in fibroblasts with *cbiG*, *cbiE*, and *cbiC* genetic defects affecting respectively the expression of MS, methionine synthase reductase (MSR) and MMACHC and in HepG2 cells transfected with corresponding siRNAs. We observed the known interactions of MS with MSR and with MMACHC as well as MMADHC with MMACHC, but we also observed novel interactions for MSR with MMACHC and with MMADHC and MS with MMADHC. Furthermore, we show that the absence of MS or MMACHC expression disrupts the interactions between the other interactome members, in *cbiC* and *cbiG* fibroblasts and in HepG2 cells transfected with siRNAs. Our data show that the processing of Cbl in cytoplasm occurs in a multiprotein complex composed of at least MS, MSR, MMACHC and MMADHC, which could contribute to shuttle safely and efficiently Cbl towards MS. Our data suggest that defective protein-protein interactions among key players of this pathway could contribute to the molecular mechanisms of the *cbiC*, *cbiG* and *cbiE* genetic defects and provide novel insights into our understanding of the pathophysiology of inherited disorders of Cbl metabolism.

1. Introduction

In man, the essential micronutrient vitamin B12 or cobalamin (Cbl) serves as cofactor for only two enzymes: methylmalonyl-CoA mutase (MCM) requires adenosylcobalamin (AdoCbl) to convert methylmalonyl-CoA to succinyl-CoA, and methionine synthase (MS) is dependent on methylcobalamin (MeCbl) to transfer a methyl group from methyltetrahydrofolate to homocysteine to produce methionine [1, 2]. Then, methionine could be used by S-adenosylmethionine synthase (MAT) to produce S-adenosylmethionine (SAM), which is the main methyl donor involved in biological methylation reactions including epigenomic regulatory mechanisms. The different molecular steps required for the synthesis of the active forms of Cbl co-factors can be affected by different genetic defects, which were historically defined as complementation groups and named from *cblA* to *cblJ* and *mut* [3].

Even though all the genes responsible for the known complementation groups are now identified, the exact function of many of the corresponding proteins is still unclear. However, the extreme reactivity of the cobalt atom and the scarcity of free Cbl in cells suggest that multiple interactions between all the proteins involved in the intracellular processing of Cbl would allow minimal exposure of Cbl to the cellular environment [4]. Indeed, several studies focused on the Cbl pathway are reporting new protein-protein interactions, which could help to elucidate the function of those proteins and also the regulatory mechanisms affected by the genetic defects [5].

Indeed, It has been discovered very recently that the two lysosomal membrane proteins LMBD1 and ABCD4, which are defective in the *cblF* and *cblJ* defects, respectively, form homodimers and that both proteins interact with low nanomolar affinity *in vitro* [6]. In addition, this study also demonstrated that LMBD1 and ABCD4 interact with MMACHC, which is deficient in the *cblC* defect. The gene product of *MMADHC*, responsible for the *cblD* defect, also interacts with MMACHC and several regions involved in this interaction were defined by recent studies [7-9]. Thus far, all the known proteins involved in the first steps of intracellular Cbl metabolism are able to interact, forming successive multiprotein complexes, LMBD1-ABCD4, LMBD1-ABCD4-MMACHC and MMACHC-MMADHC [6].

In mitochondria, the specific steps responsible for the synthesis of adenosylcobalamin are catalyzed by different proteins, which were also found to interact with each other. Indeed, while Cbl is converted into adenosylcobalamin by the adenosylcobalamin transferase MMAB, defective in the *cblB* complementation group, and is further used by MCM, deficient in the *mut* defect, the transfer of AdoCbl from MMAB to MCM is mediated by an additional protein named MMAA, defective in the *cblA* defect. It has been suggested that the interactions between these three proteins are necessary for the synthesis and correct use of AdoCbl [10]. Mutations in any of these three corresponding genes, result in inherited defects characterized by isolated methylmalonic aciduria.

The specific steps responsible for the synthesis of MeCbl are located in the cytoplasm, where the crucial role of protein-protein interactions in the regulation of this pathway is illustrated by the role of MSR to regenerate oxidized Cbl in the catalytic cycle of MS, to sustain its activity [11]. Formation of MS holoenzyme is enhanced by MSR, suggesting an additional role for MSR in chaperoning MS [12].

We have previously described for the first time a novel interaction between MS and MMACHC. Surprisingly our results pointed out the inhibition of MMACHC activity following interaction with MS inactive isoforms. These data highlight the importance of protein-protein interactions in the regulation of intracellular Cbl metabolism and the crucial role of MMACHC in the regulation of MS pathway [5]. Based on all these data, we hypothesized that MS could be the core of a large multiprotein complex. Thus, we decided to characterize the MS interactome by investigating the interactions of MS with the other proteins involved in the surrounding steps of the Cbl pathway in cytoplasm, MSR, MMACHC and MMADHC. Our data lead to the identification of interactions between the four proteins and that the impaired expression of MS or MMACHC disrupts the interactions between the other interactome members.

2. Material and methods

2.1. Cell culture

The fibroblast cell lines were provided by the University Children's Hospital Zürich, Switzerland, the University Hospital of Nancy, France, and McGill University, Canada. HepG2 cells were purchased from LGC Standards (Molsheim, France). These cells were grown in 55 cm² dishes at 37 °C in a humidified CO₂ (5%) incubator in Dulbecco's modified Eagle's medium (Gibco BRL Life Technologies) supplemented with 10% fetal calf serum (v/v) (PAA Laboratories), 1% sodium pyruvate (100 mM) and 1% (100 U) penicillin–streptomycin (v/v) (Gibco). The medium was changed every two days until the cells reached 80% or complete confluence.

2.2. siRNA transfection

The siRNAs were obtained from Life technologies (Saint Aubin, France). The siRNA sequences are (sense strand indicated): siMMACHC: 5'-CAGAAGATCGAGGACACGCTA -3'; siMMADHC: 5'- CAGAGCCAGACTGGTTTCCTA -3'; siMTR: 5'-GGAGGAGCAACCACUUCAA-3'; siMTRR: 5'-CTGGGTCTCGGTGATTCAGAA -3'; and a scrambled siRNA was used as the transfection control and designated as si non-targeting (Life Technologies, #4390847). The siRNA duplexes were transfected with lipofectamine 2000 (Invitrogen, Saint Aubin, France) 24 h after plating the cells in 6 well plates at a density of 2x10⁵ cells per well. Two days post transfection HepG2 were harvested for protein extraction. For immunofluorescence assays, siRNA duplexes were transfected 24 h after plating cells in 24 well plates at a density of 0.5x10⁵ cells per well. Two days post-transfection, the cells were fixed for immunostaining.

2.3. Western blot

Total proteins were extracted from cultured fibroblasts and from HepG2 cells using RIPA lysis buffer containing PMSF 1mM, 10 mM NAF₄, 1 mM Na₃VO₄, 1% PIC, 1% Triton X100, 0.5% DOC, 0.1% SDS (w/v) and Tris 0.05 mM (pH 8.0) after two washes with ice-cold 1X PBS. All reagents were purchased from Sigma–Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Lysates were frozen and thawed, sonicated and centrifuged at 12 000 rpm for 30 minutes. Samples (40 µg) were mixed with an equal volume of 2× Laemmli buffer, and heated for 7 minutes at 100 °C. The PVDF membranes (Millipore, Molsheim, France) were incubated overnight at 4 °C with primary antibodies diluted in TBS buffer containing 5% nonfat dry milk or 5% w/v BSA and 0.1% Tween 20 as follows: anti-MTR (rabbit polyclonal, immunogen: synthetic peptide derived from within residues 1200 to the C-terminus of Human MTR, #ab66039, Abcam), anti-MTRR (rabbit monoclonal, immunogen: synthetic peptide corresponding to residues on the C-terminus of Human MTRR, #ab129159, Abcam), anti-MMACHC (mouse monoclonal, immunogen: full length human MMACHC, #75-239, Neuro Mab), MMADHC (mouse monoclonal, gift from B. Fowler) at a dilution of 1:1000. After washing with TBS containing 0.1% Tween20, membranes were incubated for 1 h at room temperature with the appropriate secondary antibodies conjugated to HRP. Subsequently, immunoreactive proteins were visualized using the enhanced chemiluminescence (ECL kit, Amersham Biosciences, Orsay, France).

2.4. Immunoprecipitation

Cell lysates were prepared using immunoprecipitation (IP) Lysis/Wash Buffer: 0.025 M Tris, 0.15 M NaCl, 0.001 M EDTA, 1% NP-40, 5% glycerol, pH 7.4. Lysates were then centrifuged at 12 000 rpm for 10 minutes. Briefly, an aliquot of cell lysate containing exactly 500 µg of total protein was incubated with 5 µg of purified antibody and with 300-600 µl IP Lysis/Wash Buffer at 4°C overnight to form the immune complex. Then we added 20 µl of Protein A/G Agarose to the antibody/lysate sample and we incubated the mixture with gentle end-over-end mixing or shaking for 1 hour at room temperature. After removing the flow-through, we washed the resin three times with 200 µl IP Lysis/Wash Buffer then, with 100 µl of Saline Solution and centrifuge after each wash. And before applying the sample to an SDS-polyacrylamide gel, we added 50 µl of 2X SDS PAGE Sample Buffer and incubated at 100°C for 5-10 minutes.

2.5. Immunofluorescence

HepG2 and fibroblast cells were grown on slides for 48 h. Then, they were fixed with paraformaldehyde 4% for 2 hours at 4°C and blocked with BSA 1% for 1 hour. Cells were incubated with various primary antibodies: (MS, MSR, MMACHC and MMADHC) overnight in a humid chamber at 4°C under a gentle agitation. Slides were washed four times in PBS buffer containing 1% BSA and 0.1% Tween20 for 5 min then incubated with the secondary antibody for 1 h at room temperature under a gentle agitation. Detection of the nucleus was done with the nuclear fluorescent dye 4, 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (0.43 mg/ml in PBS; Sigma). Finally, slides were washed four times in PBS and mounted using a minimal volume of faramount mounting medium (DAKO,

Carpinteria, USA). The immunostained cells were imaged using Nikon C2 equipped with three laser lines (405, 488 and 543 nm). The images were obtained with x60 oil immersion lens.

2.6. DuoLink Proximity ligation assay

The proximity ligation assay (PLA; Duolink *in situ* PLA reagents; Olink Bioscience; Eurogentec, Angers, France) was performed to visualize and quantify interactions according to the manufacturer's instructions. After growing fibroblasts or HepG2 cells on slides, fixing them with paraformaldehyde 4% and blocking them with BSA 1% for 1 h, they were incubated with various primary antibodies (MS, MSR, MMACHC, MMADHC) overnight in a humid chamber at 4°C under a gentle agitation. A pair of oligonucleotide-labeled secondary antibodies (PLA probes) was used according to the manufacturer's instructions to bind to the primary antibodies. This pair of secondary antibodies generates a signal only when the two probes are in close proximity (<40 nm). The PLA signals were assigned using Nikon C2 equipped with three laser lines (405, 488 and 543 nm). Detection of the nucleus was done with the nuclear fluorescent dye 4, 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (0.43 mg/ml in PBS; Sigma). The images were obtained with x60 oil immersion lens.

3. Results

3.1. Expression of MTR, MTRR, MMACHC and MMADHC

In order to characterize the MS interactome, we used the human hepatocarcinoma HepG2 cells and fibroblasts from various complementation groups, including cbIC, cbID, cbIE and a specific subset of cbIG cells, called CblG variant (cbIG*) which are devoid of any MS activity [13]. The gene mutations of fibroblasts and their predicted effects are detailed in Table 1.

Table 1. Description of the patient fibroblasts used in this study

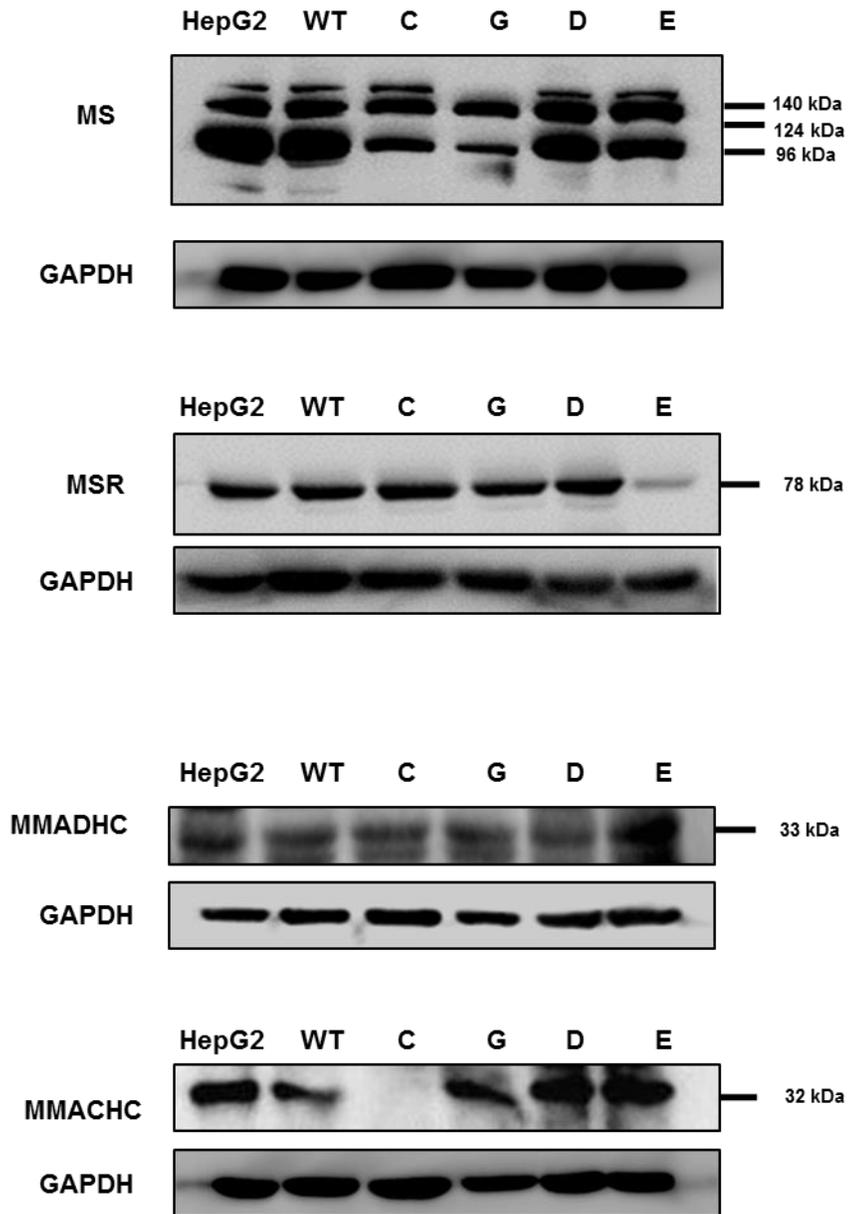
Name	Complementation group	Mutated gene	cDNA mutation	Predicted effect on protein	Reference
WT	Control	-	-	-	5
C	cbIC	<i>MMACHC</i>	c.271dupA c.271dupA	p.Arg91LysfsX14 p.Arg91LysfsX14	#
G*	cbIG	<i>MTR</i>	c.609+1088G>A c.609+1088G>A	p.A203EfsX13 p.A203EfsX13	5
D	cbID	<i>MMADHC</i>	c.696+1_4delGTGA	p.F204_232del p.F204_232del	14

			c.696+1_4delGTG		
			A		
E	cbIE	<i>MTRR</i>	c.7A>T	p.R3W	#
			c.7A>T	p.R3W	

5. Fofou-Caillierez et al, 2013; #. MR Baumgartner (not published); 14. Coelho et al, 2008.

First of all, we performed Western blot analyses to ensure that the four proteins MS, MSR, MMACHC and MMADHC are expressed in HepG2 cells and in the patient fibroblasts (Fig. 1A).

a



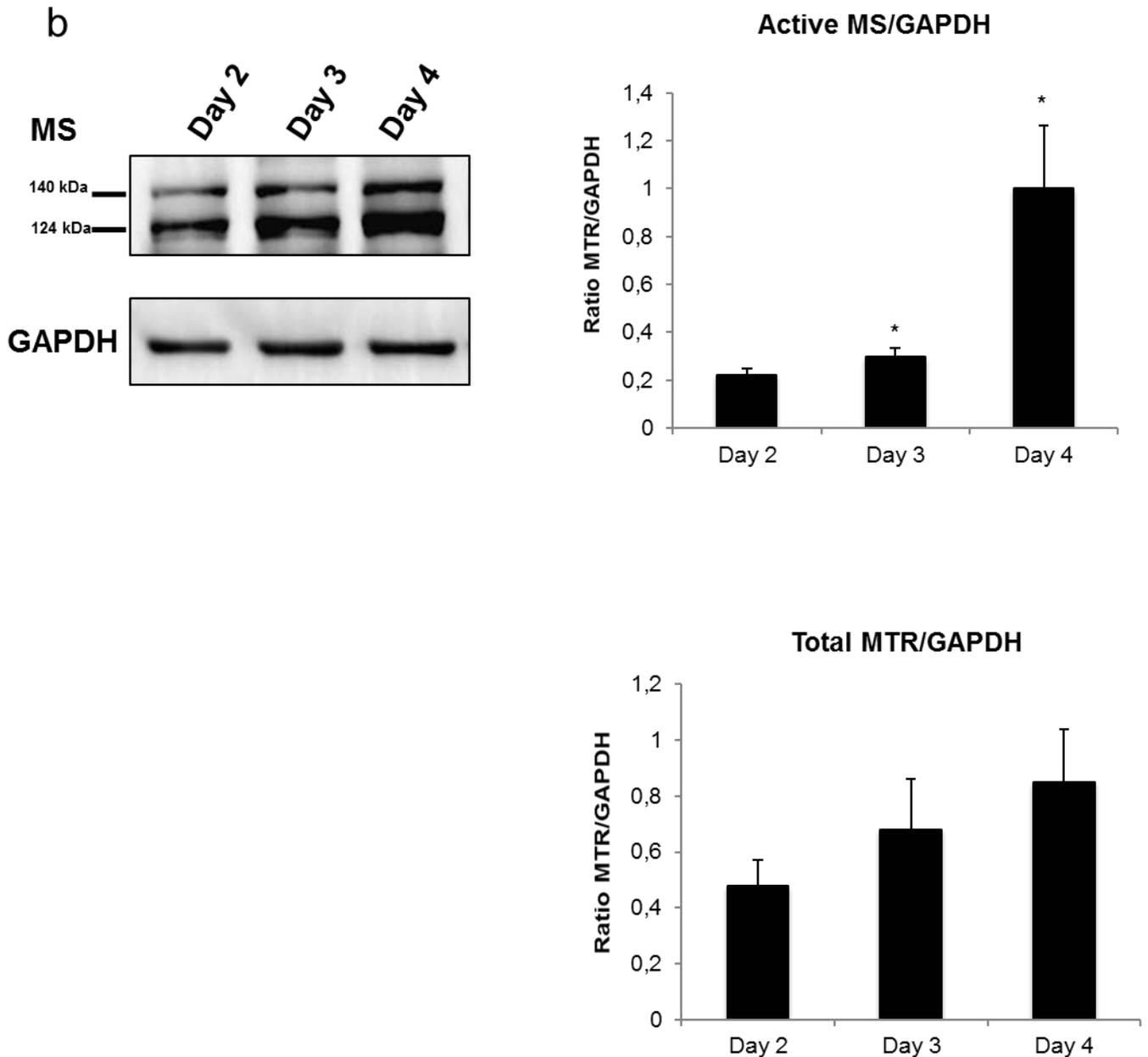


Fig. 1. Expression of MS isoforms, MSR, MMADHC and MMACHC in HepG2 cells and in patient fibroblasts. (a) Western blot of the active 140 kDa and the inactive 124 kDa isoforms of methionine synthase (MS), methionine synthase reductase (MSR), MMACHC and MMADHC proteins in HepG2 cells and control, cb1C, cb1G-variant, cb1D and cb1E fibroblasts. GAPDH was used as an internal control of protein expression. (b) Western blot of MS isoforms in HepG2 cells in proliferation (day 2 and day 3) and in confluency (day 4). Densitometric analysis of three different Western blots shows the quantification of MS isoforms in HepG2 cells at different stages of proliferation. One-way

ANOVA and Tukey post-hoc analysis were used to compare the means at the different stages (*P< 0.05 compared to day 4).

As expected, both MMADHC and MMACHC were expressed in all cell lines tested, except for MMACHC in the cbIC cell line that carries a mutation leading to premature termination of translation in both alleles. MSR was also detected in all cell lines except in the cbIE fibroblasts. Even though the *MTRR* mutation in this cell line would lead to a missense mutation, it is likely that the very early nucleotide change would lead to a disruption of the normal splicing. We previously demonstrated that two 140 kDa and 124 kDa MS isoforms are expressed in human cells and that the ratio between the active 140 kDa form and the inactive truncated 124 kDa isoform differs according to the proliferation state of the cells with a decrease of the active form and an increase of the inactive form at confluency in Caco2 cells [5]. Interestingly, in HepG2 cells we observed an increasing expression of both isoforms during the time of culture (Fig. 1B). Our results indicated that all the fibroblasts expressed the two MS isoforms in contrast of the cbIG variant cell line that did not express the active form [5].

3.2. Identification of novel interactions: MS/MMADHC, MSR/MMADHC and MSR/MMACHC

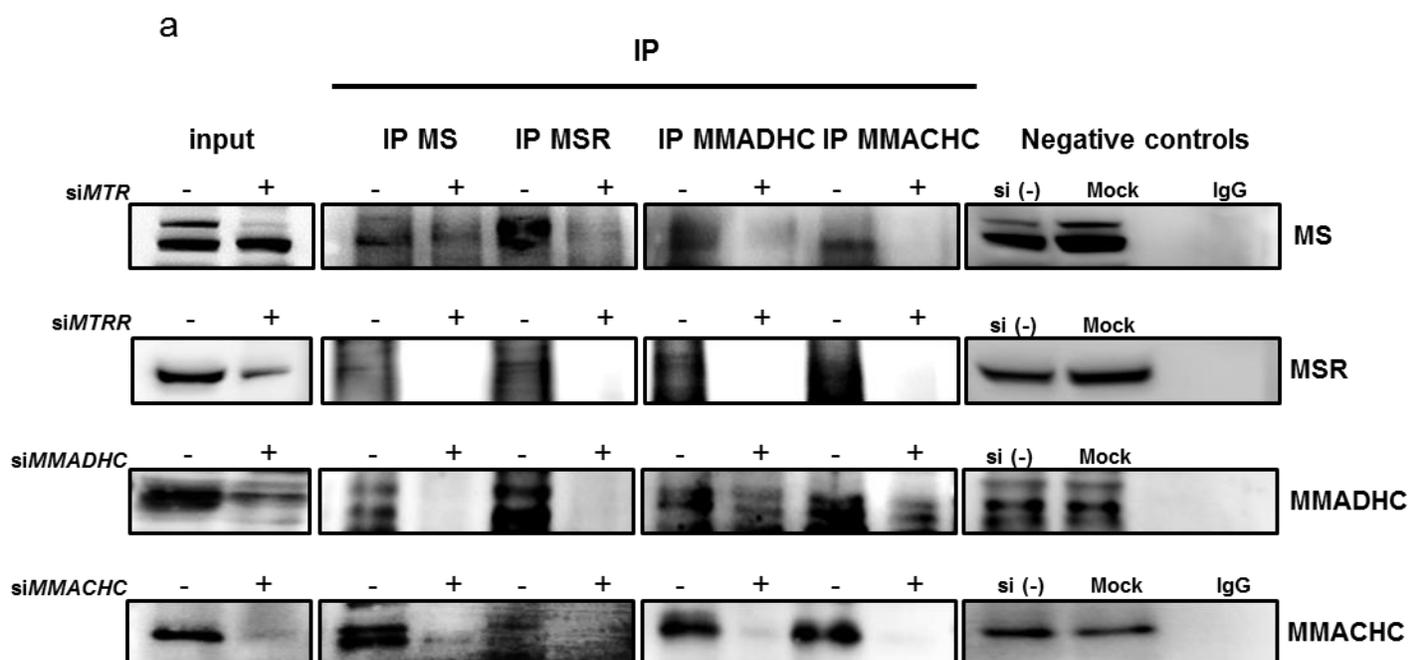
3.2.1. Immunoprecipitation experiments in HepG2 cells

HepG2 cell extracts were submitted to a series of systematic immunoprecipitations and subsequent Western blots using antibodies against each of these proteins in order to dissect all the interactions among MS, MSR, MMACHC and MMADHC, (Fig. 2A). Our data provide evidence of novel interactions between MS with MMADHC, MSR with MMADHC, and MSR with MMACHC (Fig. 2A). Similarly, the specificity of the signals was confirmed by the disappearance of the band following knock-down of the different genes by the corresponding siRNA.

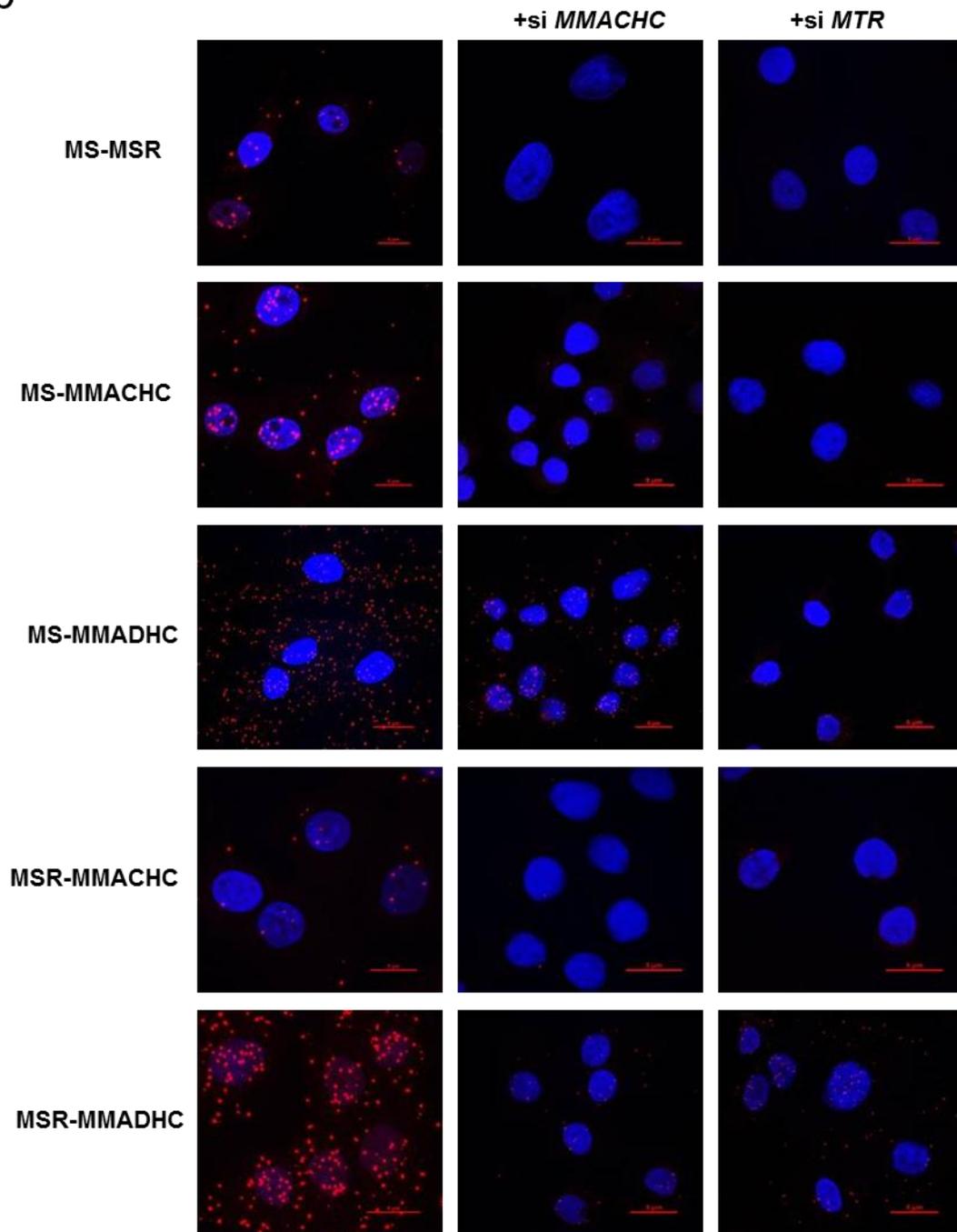
3.2.2. DuoLink *in situ* proximity ligation assays in HepG2 cells

DuoLink *in situ* proximity ligation assays (PLA) were performed to confirm the results obtained by co-immunoprecipitation. This technique allows both visualization and quantification of protein-protein interactions by generating a signal visualized by confocal microscopy only if the two proteins are closer than 40nm, thus suggesting a direct interaction. Experiments were performed in HepG2 cells using various sets of antibodies directed between MS, MSR, MMACHC and MMADHC (Fig. 2B). Positive signals were obtained with all the combinations of antibodies, thus confirming the existence of interactions between these proteins. However, our results do not indicate so far whether these interactions are sequential or if they occur in a multiprotein complex. In order to test the hypothesis of a large multiprotein complex containing at least these four proteins, we investigated the consequence of the absence of MS and MMACHC expression in all the different interactions previously detected. To do so, we repeated the DuoLink assays in HepG2 cells transfected with siRNAs targeted against *MTR* and *MMACHC* (Fig. 2B). As expected, following *MTR* knock-down, we were not able to

detect a positive signal for the MS-MSR, MS-MMACHC and MS-MMADHC interactions. However, our results also showed a dramatic decrease of the number and the intensity of red blobs for MSR-MMACHC and for MSR-MMADHC interactions, demonstrating the importance of MS in these two interactions. Similarly, following *MMACHC* knock-down, we observed a decrease of MSR-MMADHC interaction beside the expected decrease of MS-MMACHC and MSR-MMACHC interactions. Our results also showed a dramatic decrease of MS-MSR interaction. The interaction between MSR and MMADHC was the only one not significantly affected by siMMACHC transfection.



b



C

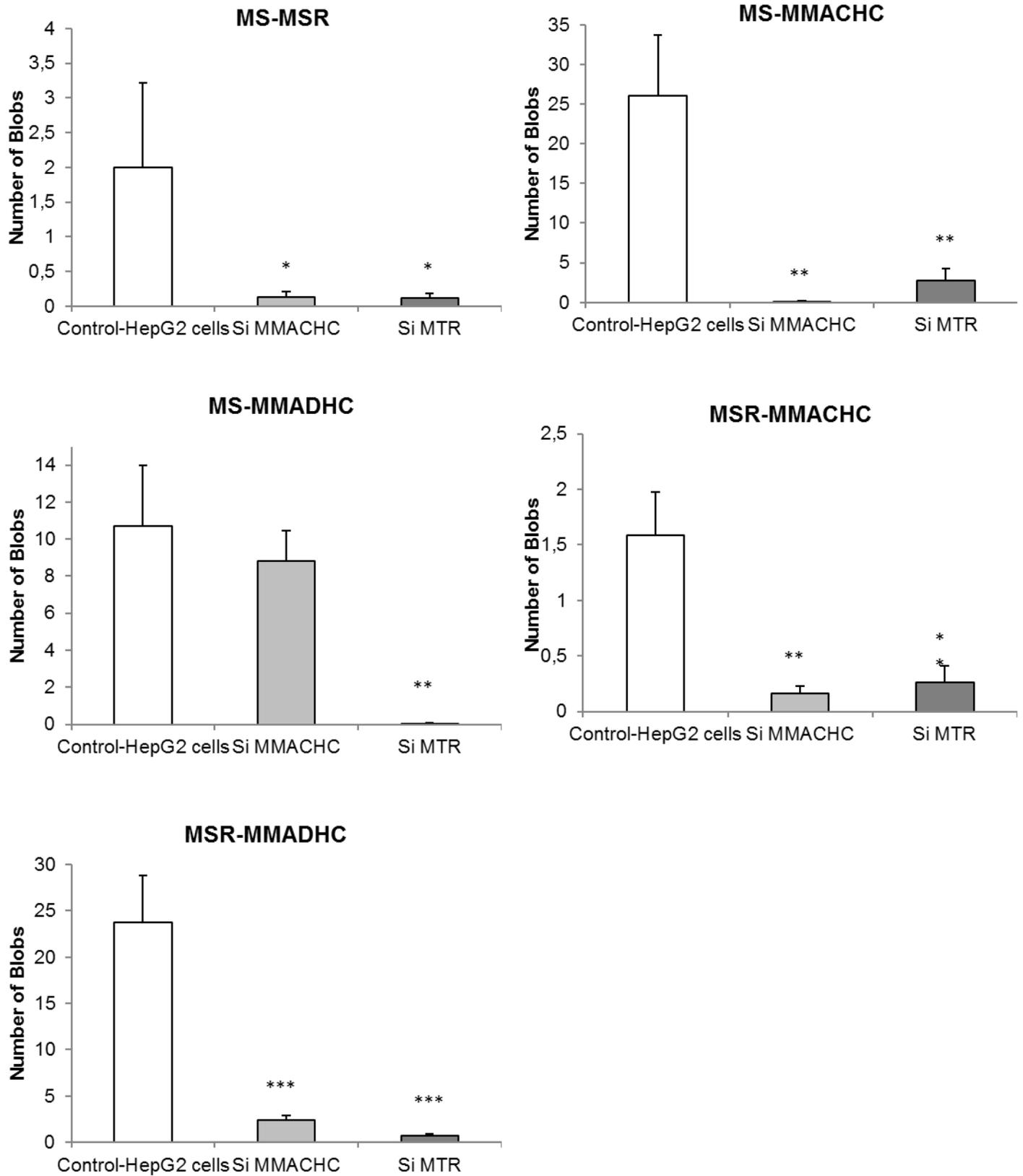


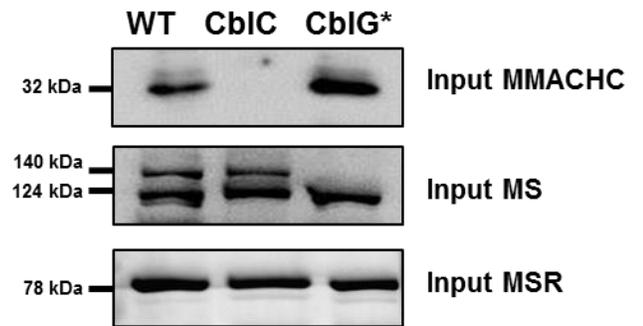
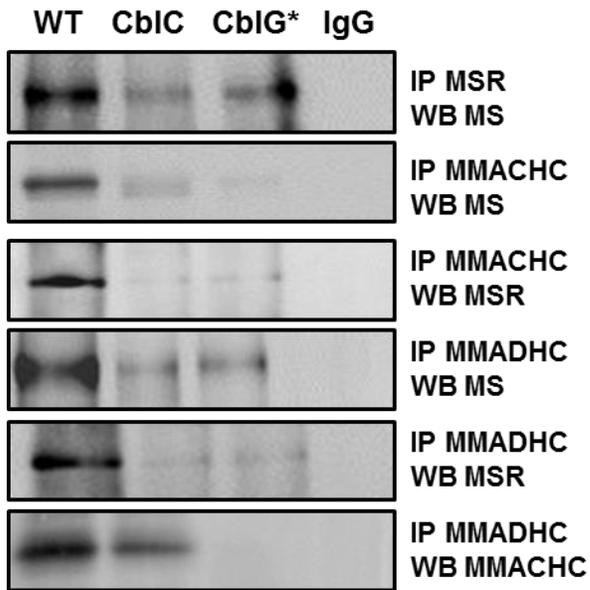
Fig. 2. Evidence of protein-protein interactions between MS/MSR, MS/MMACHC, MS/MMADHC, MSR/MMACHC, MSR/MMADHC and MMADHC/MMACHC on HepG2 cells. (a) Co-immunoprecipitation assay was performed with anti-MS, anti-MSR, anti-MMACHC and anti-MMADHC on HepG2 cells before and following transfection with siRNA directed against *MTR*, *MTRR*, *MMACHC* and *MMADHC*. Lysates from cells transfected with siRNA targeting non-mammalian genes, si(-), and from mock transfected cells were used as negative controls as well as immunoprecipitates with IgG antibodies. Cell lysates and immunoprecipitates were analyzed by Western blot. (b) Proximity ligation assays (Duolink) between MS/MSR, MS/MMACHC, MS/MMADHC, MSR/MMACHC, MSR/MMADHC and MMADHC/MMACHC were performed on HepG2 cells before and after transfection with siRNA directed against *MTR* and *MMACHC* genes. The quantification of linkage was performed by counting the average number of blobs per cell from at least 30 cells and represented in the histograms (*P <0.05; **P <0.01; ***P <0.001). The red bars indicate the scale corresponding to 5 μ m.

3.3. Confirmation of interactions in patient fibroblasts

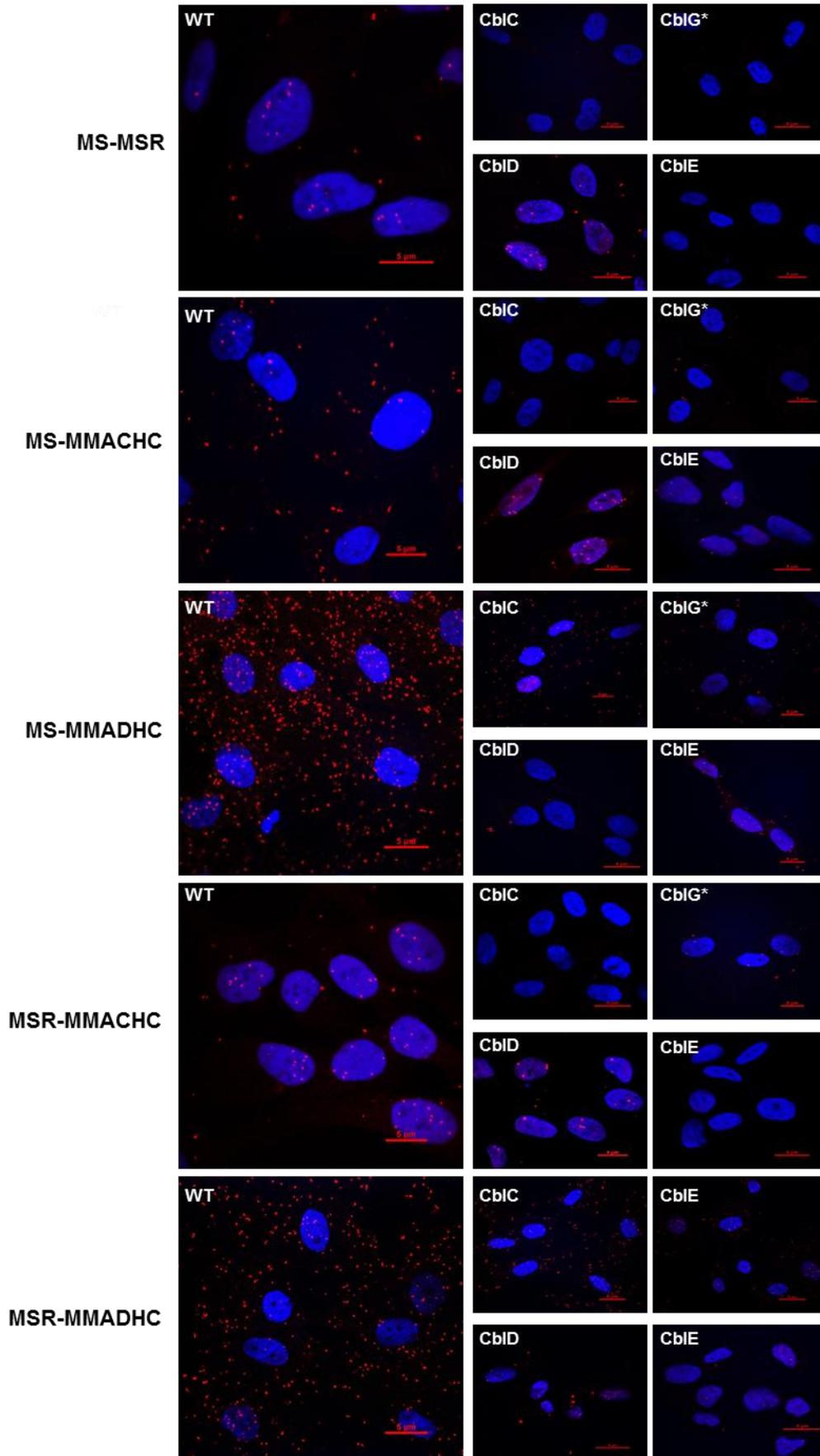
3.3.1. Immunoprecipitation experiments in patient fibroblasts

In order to confirm the physiological importance of MMACHC and MS in the interactions mentioned above, we performed a series of co-immunoprecipitations in fibroblasts from a cbIC patient homozygous for the c.271dupA (p.Arg132*) mutation, from a cbIG variant patient homozygous for the c.609+1088G>A (pA203EfsX13) mutation and from a control cell line (Table 1 and Fig. 3A). Cell lysates were immunoprecipitated with anti-MMADHC, anti-MMACHC and anti-MSR antibodies and subjected to Western blotting analysis for MS, MSR or MMACHC to test all the different interactions. Results from the control fibroblasts confirmed all the interactions detected previously in HepG2 cells. As expected, in cbIC and in cbIG variant fibroblasts the bands corresponding to the interaction between MMACHC and MS were markedly reduced. However, the bands corresponding for the MSR-MS, MMADHC-MS and MMADHC-MSR were also dramatically decreased. In cbIG variant fibroblasts, the bands corresponding for the MMACHC-MSR, MMADHC-MS and MMADHC-MMACHC interactions were also markedly decreased. Thus, these results confirmed the role of MMACHC and MS in the formation of all the tested interactions.

a



b



C

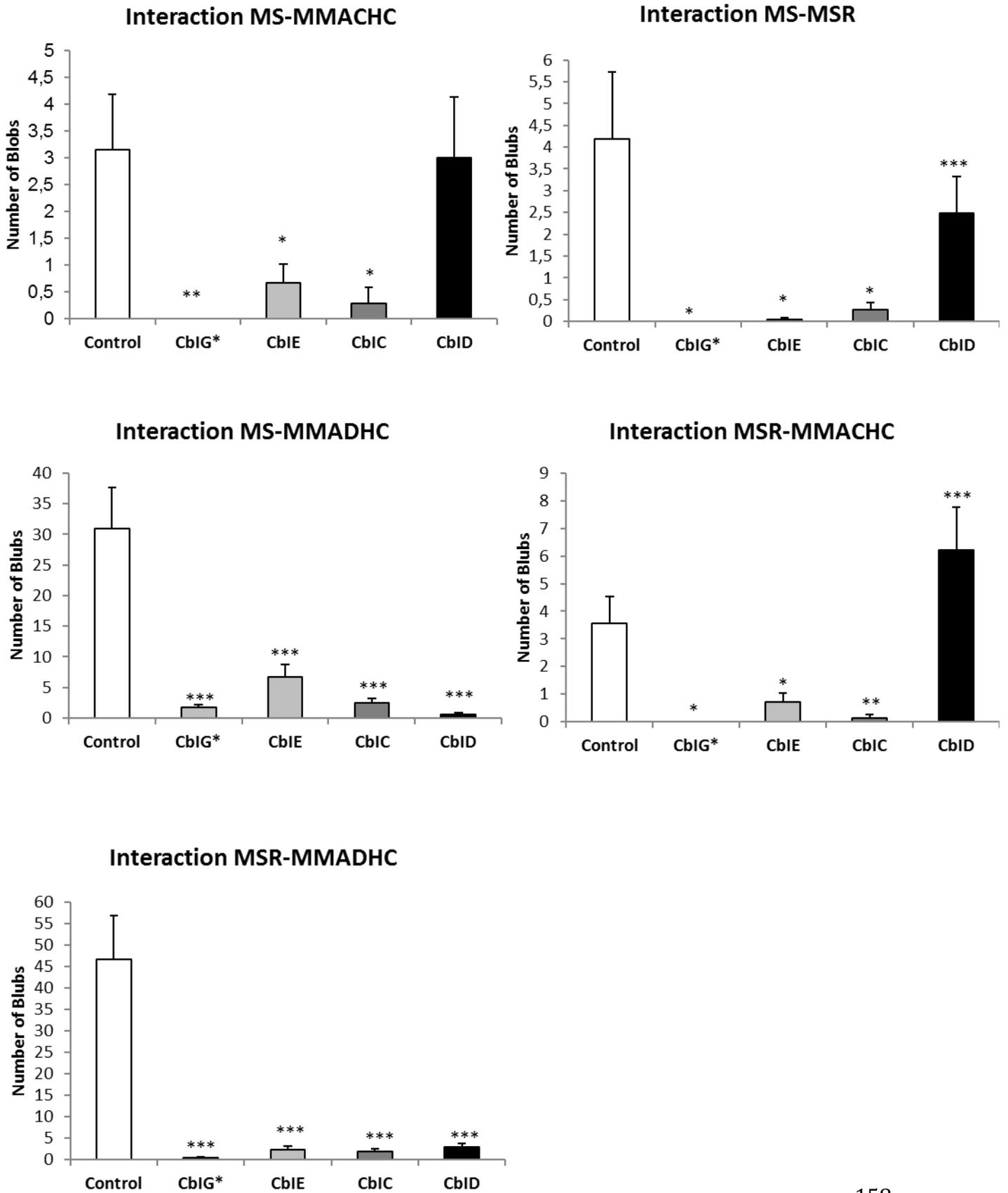


Fig. 3. Confirmation of protein interactions between MS/MSR, MS/MMACHC, MS/MMADHC, MSR/MMACHC, MSR/MMADHC and MMADHC/MMACHC on fibroblast cells. (a) Co-immunoprecipitation assay was performed on control, cbIC and cbIG-variant fibroblast cells with antibodies against MSR, MMACHC and MMADHC. These immunoprecipitates were subjected to Western blot for MS, MSR or MMACHC. (b) Proximity ligation assays (Duolink) of interactions between MS/MSR, MS/MMACHC, MS/MMADHC, MSR/MMACHC, and MSR/MMADHC were carried out on control, cbIC, cbIG-variant, cbID and cbIE fibroblast cells. The quantification of linkage was performed by counting the average number of blobs per cell from at least 30 cells. The intensities of interactions are shown in the histograms (*P <0.05; **P <0.01; ***P <0.001).

3.3.2. DuoLink *in situ* proximity ligation assays in patient fibroblasts

We studied the consequence of *MTR*, *MTRR*, *MMACHC* or *MMADHC* mutations on MS interactome by measuring *in situ* the interactions in fibroblasts from cbIG variant, cbIE, cbIC and cbID patients, respectively (Fig. 3B). Our results clearly show that the absence of MMACHC, MS and MSR expression results in dramatic decrease in all the interactions tested among the four proteins. The MMADHC mutations carried by the cbID cell line used in our study lead to an exon skipping and to a deletion of 28 amino acid residues but the absence of frameshift allows the translation of a truncated protein (p.F204_232del). Our data indicated that in these cbID fibroblasts, the interactions between MMADHC and MSR and between MMADHC and MS were markedly reduced while interactions between MS and MSR, MS and MMACHC and between MSR and MMACHC were not significantly affected.

4. Discussion

Using a series of co-immunoprecipitation experiments and DuoLink *in situ* proximity ligation assays, this study aimed at identifying whether MS is the core of a cytoplasmic multifunction protein complex of Cbl metabolism through interactions with MSR, MMACHC and MMADHC. Our data revealed interactions of MS with MSR, MMACHC and MMADHC, MSR with MMACHC and MMADHC, and MMACHC with MMADHC. The specificity of these interactions was ascertained in HepG2 cells transfected with siRNA targeted against *MTR*, *MTRR*, *MMACHC* and *MMADHC* and in fibroblasts from patients with the corresponding cbIG and cbIC defects.

These interactions are consistent with previous data of the literature. The modular architecture of MS could be divided in multiple functional domains that are able to bind homocysteine, methyltetrahydrofolate, Cbl and SAM, respectively. The SAM-binding domain, or re-activation domain, has been shown to interact with the FMN binding domain of MSR in solution studies [15]. Similarly, a docking analysis suggested that the region of MS located between Leu696 and Val765, contained in the Cbl binding domain, could be involved in the interaction with MMACHC [5]. Different amino acid residues of MMACHC have been predicted to be involved this interaction: 80, 109-111, 144-161 and

200-230 (Fig. 4). It is very likely that this interaction between the chaperone protein MMACHC and MS is necessary for providing Cbl to MS. Altogether, these data indicate that the domains involved in the MS-MSR interaction would be different from those implicated in the MS-MMACHC interaction.

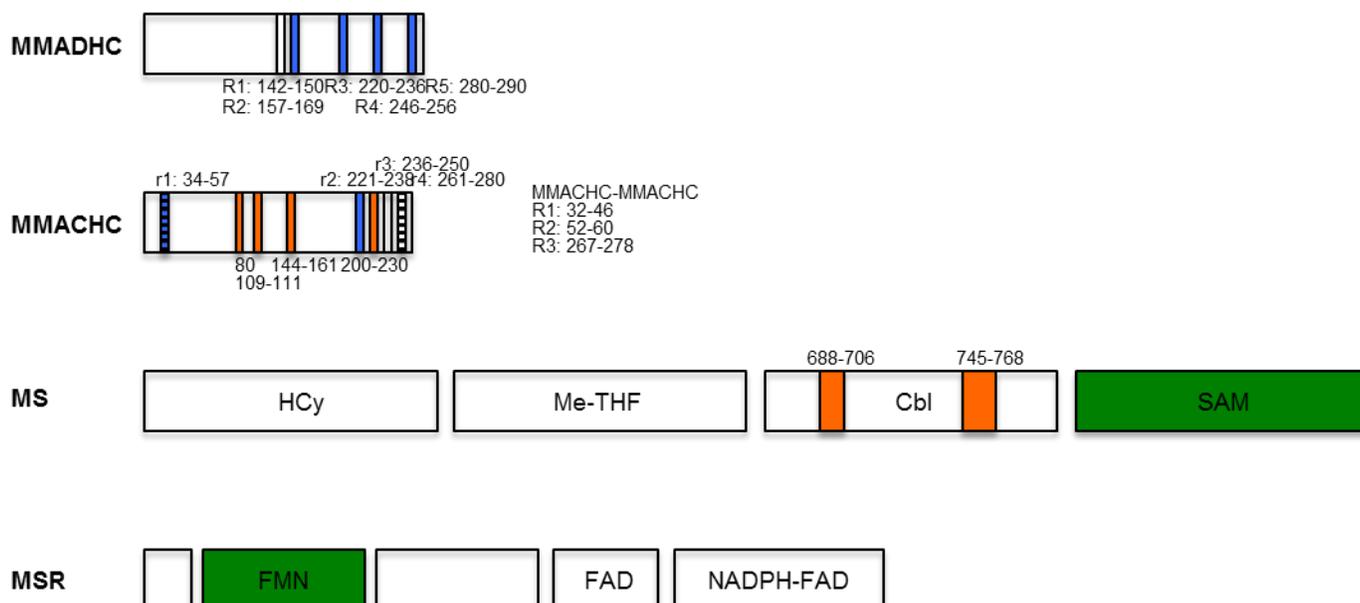


Fig. 4. Schematic representation of the regions involved in the interactions between MS, MSR, MMACHC and MMADHC. Colouring represents protein regions likely involved in interaction, Blue: interaction between MMADHC and MMACHC; Orange: interaction between MMACHC and MS; Green: interaction between MS and MSR.

Our results obtained with HepG2 cells transfected with siMMACHC and with cblC fibroblasts showed that MMACHC plays an important role in the MS-MSR interaction. Even though various studies performed with purified proteins or fragments have already demonstrated that the MS-MSR interaction does not necessarily require MMACHC, it cannot be excluded that MMACHC contributes to the stability of the MS-MSR interaction *in vivo*. Additionally, it has been shown that MSR enhances the binding of Cbl by apo-MS [12]. It was suggested that this effect could result from MS stabilization by MSR and from the reduction of aquacobalamin to cob(II)alamin, which enhances MS holoenzyme formation. However, another study demonstrated that the MS-MSR interaction was required for the insertion of Cbl [15]. Since, Cbl is probably presented to MS by MMACHC, this could suggest that the MS-MSR interaction could benefit from MS-MMACHC interaction. Taken together, all these data support the concept of the formation of a multifunctional protein complex containing at least MMACHC, MS and MSR, in which the presence of each protein would strengthen the interactions between the two others. Our results also suggest that the lack of MMACHC protein in some cblC

fibroblasts could affect MS activity through the impaired processing of Cbl but also by decreasing the efficiency of the crucial MS-MSR interaction [5].

The interactions observed between MMACHC with MMADHC in fibroblasts are consistent with previous studies performed with purified recombinant proteins and/or in bacteria. Interestingly, the MMACHC domains that could interact with MS are different from those involved in the interaction with MMADHC. Using phage panning, Deme et al have found that four MMACHC regions could be involved in the interaction with MMADHC. These regions were defined as region I (34-57), region II (221-238), region III (236-250) and region IV (261-280). However, three other MMACHC regions defined as R1 (32-46), R2 (52-60) and R3 (267-278) are supposed to be involved in MMACHC oligomerization (Fig. 4). Since, the two regions r1 and r4 could be either involved in MMADHC or in MMACHC binding, it was hypothesized that MMACHC dimers could dissociate to allow MMACHC-MMADHC interaction [8]. However, a recent study performed with human recombinant proteins has demonstrated that the MMACHC regions located between 236 and 282, corresponding to previously defined region III and IV, are not required for the interaction with MMADHC [16]. Similarly, while phage spanning experiments first indicated that five regions of the carboxy domain part of MMADHC could be involved in the MMADHC-MMACHC interaction: residues 142-150, 157-169, 220-236, 246-256 and 280-290, it was later demonstrated that the first 153 aminoacids of MMADHC are not required for the interaction with MMACHC [5; 12]. Interestingly, *in vitro* studies have shown that MMACHC is also able to bind the two lysosomal membrane proteins LMBD1 and ABCD4 [6]. However, the MMACHC residues involved in these interactions are not known so far. It is interesting to note that while MMADHC is necessary for the delivery of Cbl to its target enzymes, all the studies published so far concluded that MMADHC is not able to bind Cbl [14, 16]. Thus, the MMADHC targeting function could mainly rely on its interaction with MMACHC. By showing that the absence of the active MS isoform affects the formation of the MMACHC-MMADHC interaction, our results also suggest that in patients with the cblG defect associated with the lack of MS synthesis, the presentation of Cbl to its mitochondrial destination could also be disturbed since MMACHC-MMADHC interaction could occur within a large multiprotein complex containing also MS and MSR. Altogether, our study indicates that the absence of any of the three core proteins of the interactome, MS, MSR and MMACHC, results in decreased interactions among the 4 proteins MS, MSR, MMACHC and MMADHC. Indeed, even though the interactions between MMADHC and the other three proteins are disturbed by the absence of any of them, the loss of full length MMADHC does not affect the interactions between MMACHC, MS and MSR. This provides a novel hypothesis to explain the decreased MS activity reported in fibroblasts with genetic defects other than cblG. For example, it has been shown that MS activity is decreased in cblC and in cblD cell lines, even in presence of MeCbl in the cell medium [17].

Interestingly, among the pathways of the one carbon metabolism, the reaction catalyzed by MS is the only one in which the formation of a multienzyme complex has not yet been

demonstrated [18, 19]. Indeed, the formation of protein complexes, also named metabolons, is a common feature in many metabolic pathways including glycolysis, the tricarboxylic acid cycle, purine synthesis and branched-chain amino acid catabolism [19-22]. These protein assemblies would result in a more efficient metabolic flux than with free-floating isolated enzymes by preventing the loss of intermediates and by improving the control of the catalytic reactions [23-24].

5. Conclusion

In conclusion, we propose a model of the intracellular Cbl pathway leading to the synthesis of both co-factors (Fig. 5). Our results provide experimental evidence in human cells of novel protein-protein interactions in the intracellular metabolism of Cbl and suggest the existence of a multiprotein complex containing at least MS, MSR, MMACHC and MMADHC that we named the “MS interactome”. This complex would combine a safe and efficient processing, shuttling and targeting of vitamin B12 from MMACHC to MS for the synthesis of MeCbl. This would contribute to protect this scarce vitamin from the cytoplasmic milieu and hence to maximize the metabolic efficiency of the whole process. In addition, our findings that these interactions are decreased in patient fibroblasts highlight the central role of MS in the regulation of intracellular metabolism of Cbl and suggest that defective protein-protein interactions among key players of this pathway could contribute to the molecular basis of the *cbiC*, *cbiD*, *cbiG* and *cbiE* genetic defects.

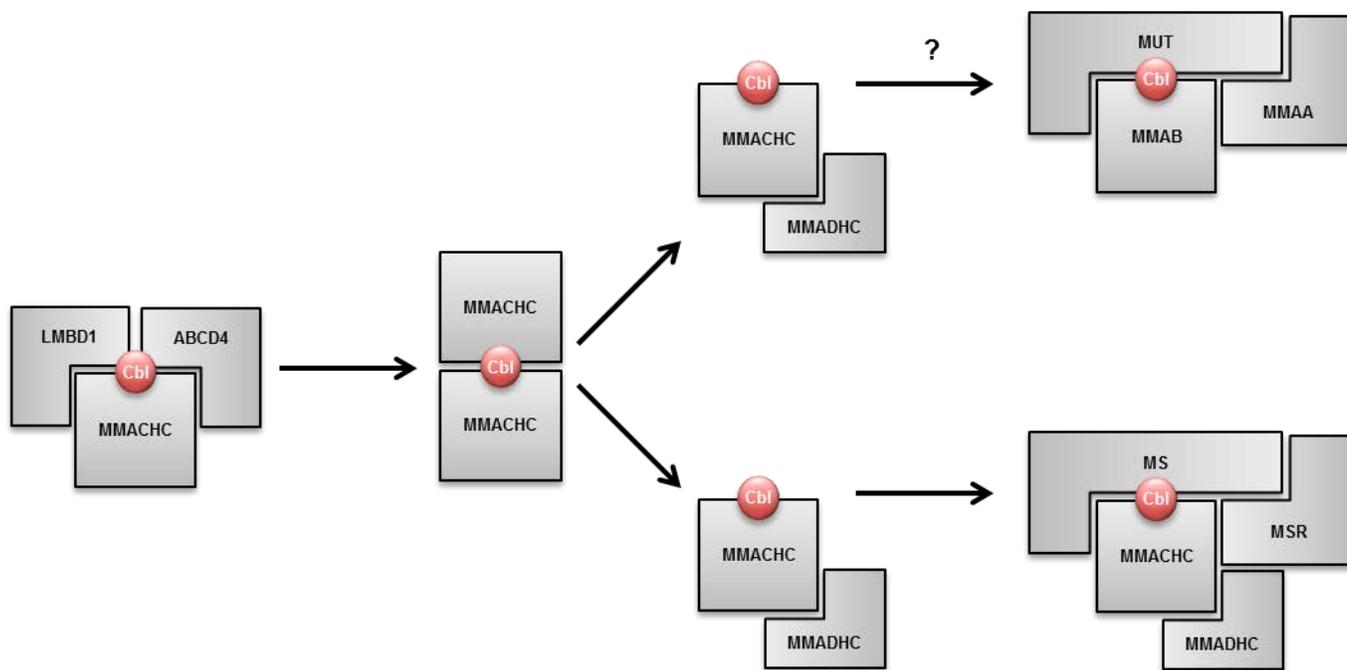


Fig. 5. Proposed model of the protein-protein interactions required shuttling Cbl from the lysosomal compartment to MS. Cbl is released from the lysosomes in an active process requiring LMBD1 and ABCD4. Both proteins interact with MMACHC, which chaperones

Cbl in the cytoplasm, possibly in a dimer form. Cbl is then dealkylated or decyanated by MMACHC. MMACHC interacts with MMADHC, which is necessary for Cbl partitioning towards either the MeCbl dependent remethylation pathway catalyzed by MS in cytoplasm or the AdoCbl synthesis pathway in mitochondria. MMACHC is necessary for the delivery of Cbl to MS-MSR, and according to the results of this study, we hypothesize that the MMACHC-MMADHC interaction could also occur within a large multiprotein complex containing also MS and MSR, we propose to name the MS interactome.

Acknowledgments

This work was supported by fundings from Inserm, Région Lorraine, Nancy Hospital, and Fondation Jérôme Lejeune. This study is a part of the project entitled “Etude des mécanismes moléculaires à l’origine des pathologies associées à un dysfonctionnement du métabolisme des monocarbones” that is co-funded by the European Union within the framework “FEDER-ESF Lorraine et Massif des Vosges 2014-2020”.

References

- [1] R. Banerjee, C. Gherasim, D. Padovani, The tinker, tailor, soldier in intracellular B12 trafficking, *Curr Opin Chem Biol.* 13 (2009) 484-491.
- [2] C. Gherasim, M. Lofgren, R. Banerjee, Navigating the B(12) road: assimilation, delivery, and disorders of cobalamin. *J. Biol. Chem.* 288 (2013) 13186-93.
- [3] D. Watkins, D.S. Rosenblatt, Lessons in biology from patients with inborn errors of vitamin B12 metabolism, *Biochimie* 95 (2013) 1019-22.
- [4] D. Coelho, J.C. Kim, I.R. Miousse, S. Fung, M. du Moulin, I. Buers, T. Suormala, P. Burda, M. Frapolli, M. Stucki, P. Nürnberg, H. Thiele, H. Robenek, W. Höhne, N. Longo, M. Pasquali, E. Mengel, D. Watkins, E.A. Shoubridge, J. Majewski, D.S. Rosenblatt, B. Fowler, F. Rutsch, M.R. Baumgartner, Mutations in ABCD4 cause a new inborn error of vitamin B12 metabolism, *Nat. Genet.* 44 (2012) 1152-5.
- [5] M.B. Fofou-Caillierez, N.T. Mrabet, C. Chéry, N. Dreumont, J. Flayac, M. Pupavac, J. Paoli, J.M. Alberto, D. Coelho, J.M. Camadro, F. Feillet, D. Watkins, B. Fowler, D.S. Rosenblatt, J.L. Guéant, Interaction between methionine synthase isoforms and MMACHC: characterization in cblG-variant, cblG and cblC inherited causes of megaloblastic anaemia, *Hum. Mol. Genet.* 22 (2013) 4591-601.
- [6] J.C. Deme, M.A. Hancock, X. Xia, C.A. Shintre, M. Plesa, J.C. Kim, E.P. Carpenter, D.S. Rosenblatt, J.W. Coulton, Purification and interaction analyses of two human lysosomal vitamin B12 transporters: LMBD1 and ABCD4, *Mol. Membr. Biol.* 31 (2014) 250-61.

- [7] M. Plesa, J. Kim, S.G. Paquette, H. Gagnon, C. Ng-Thow-Hing, B.F. Gibbs, M.A. Hancock, D.S. Rosenblatt, J.W. Coulton, Interaction between MMACHC and MMADHC, two human proteins participating in intracellular vitamin B₁₂ metabolism. *Mol. Genet. Metab.* 102 (2011) 139-48.
- [8] J.C. Deme, I.R. Miousse, M. Plesa, J.C. Kim, M.A. Hancock, W. Mah, D.S. Rosenblatt, J.W. Coulton, Structural features of recombinant MMADHC isoforms and their interactions with MMACHC, proteins of mammalian vitamin B₁₂ metabolism. *Mol. Genet. Metab.* 107 (2012) 352-62.
- [9] C. Gherasim, L. Hannibal, D. Rajagopalan, D.W. Jacobsen, R. Banerjee, The C-terminal domain of CblD interacts with CblC and influences intracellular cobalamin partitioning. *Biochimie* 95 (2013) 1023-32.
- [10] D. Padovani, T. Labunska, R. Banerjee, Energetics of interaction between the G-protein chaperone, MeaB, and B₁₂-dependent methylmalonyl-CoA mutase, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 17838-44.
- [11] A. Wilson, D. Leclerc, D.S. Rosenblatt, R.A. Gravel, Molecular basis for methionine synthase reductase deficiency in patients belonging to the cblE complementation group of disorders in folate/cobalamin metabolism, *Hum. Mol. Genet.* 8 (1999) 2009-16.
- [12] K. Yamada, R.A. Gravel, T. Toraya, R.G. Matthews, Human methionine synthase reductase is a molecular chaperone for human methionine synthase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103 (2006) 9476-81.
- [13] S.L. Sillaots, C.A. Hall, V. Hurteloup, D.S. Rosenblatt, Heterogeneity in cblG: differential retention of cobalamin on methionine synthase, *Biochem. Med. Metab. Biol.* 47 (2012): 242-249
- [14] D. Coelho, T. Suormala, M. Stucki, J.P. Lerner-Ellis, D.S. Rosenblatt, R.F. Newbold, M.R. Baumgartner, B. Fowler, Gene identification for the cblD defect of vitamin B₁₂ metabolism, *N. Engl. J. Med.* 358 (2008) 1454-64.
- [15] K.R. Wolthers, N.S. Scrutton, Cobalamin uptake and reactivation occurs through specific protein interactions in the methionine synthase-methionine synthase reductase complex, *FEBS J.* 276 (2009) 1942-51.
- [16] D.S. Froese, J. Kopec, F. Fitzpatrick, M. Schuller, T.J. McCorvie, R. Chalk, T. Plessl, V. Fettelschoss, B. Fowler, M.R. Baumgartner, W.W. Yue, Structural Insights into the MMACHC-MMADHC Protein Complex Involved in Vitamin B₁₂ Trafficking, *J Biol Chem.* 290 (2015) 29167-77.

- [17] T. Suormala, M.R. Baumgartner, D. Coelho, P. Zavadakova, V. Kozich, H.G. Koch, M. Berghäuser, J.E. Wraith, A. Burlina, A. Sewell, J. Herwig, B. Fowler, The *cbiD* defect causes either isolated or combined deficiency of methylcobalamin and adenosylcobalamin synthesis, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 42742-9.
- [18] M. Scotti, L. Stella, E.J. Shearer, P.J. Stover, Modeling cellular compartmentation in one-carbon metabolism, *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* 5 (2013) 343-65.
- [19] S. An, R. Kumar, E.D. Sheets, S.J. Benkovic, Reversible compartmentalization of de novo purine biosynthetic complexes in living cells, *Science* 320 (2008) 103-6.
- [20] F.M. Meyer, J. Gerwig, E. Hammer, C. Herzberg, F.M. Commichau, U. Völker, J. Stülke, Physical interactions between tricarboxylic acid cycle enzymes in *Bacillus subtilis*: evidence for a metabolon, *Metab Eng.* 13 (2011) 18-27.
- [21] M.M. Islam, R. Wallin, R.M. Wynn, M. Conway, H. Fujii, J.A. Mobley, D.T. Chuang, S.M. Hutson, A novel branched-chain amino acid metabolon. Protein-protein interactions in a supramolecular complex. *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 11893-903.
- [22] A.E. Lyubarev, B.I. Kurganov, Supramolecular organization of tricarboxylic acid cycle enzymes, *BioSystems*, 22 (1989) 91-102.
- [23] P. Amar, G. Legent, M. Thellier, C. Ripoll, G. Bernot, T. Nystrom, M.H. Saier, V. Norris, A stochastic automaton shows how enzyme assemblies may contribute to metabolic efficiency. *BMC Syst. Biol.* 2 (2008) 27.
- [24] M. Castellana, M.Z. Wilson, Y. Xu, P. Joshi, I.M. Cristea, J.D. Rabinowitz, Z. Gitai, N.S. Wingreen, Enzyme clustering accelerates processing of intermediates through metabolic channeling. *Nat Biotechnol.* 32 (2014) 1011-8.

Résumé :

La découverte récente de nouveaux gènes, de mécanismes d'épissage alternatif et d'interactions entre les protéines du métabolisme intracellulaire de la Cbl suggère que de nouvelles interactions protéiques peuvent prendre part aux mécanismes de régulation de ce métabolisme. Nos données confirment, dans les cellules humaines des HepG2 et des fibroblastes de patients CblC et cblG, diverses interactions qui ont été jusqu'à présent que décrites *in vitro* ou chez les bactéries : MS avec méthionine synthase réductase (MSR), MS avec MMACHC et MMACHC avec MMADHC. Nos données révèlent également de nouvelles interactions : MMADHC avec MS, MMADHC avec MSR, MSR avec MMACHC et MS avec les isoformes de MAT. De plus, l'absence de MS ou MMACHC perturbe les interactions impliquant les autres partenaires protéiques de l'interactome MS. En conclusion, cette étude suggère que les différentes étapes du métabolisme intracellulaire de Cbl pourraient se produire dans un grand complexe multiprotéique composé d'au moins de MS, MSR, MMACHC, MMADHC et les isoformes de MAT, et qui contribuerait à protéger la Cbl du milieu cytoplasmique.

Mots clés : Cobalamine, interactome, méthionine synthase, methionine synthase réductase, MMACHC, MMADHC

Summary:

The recent discovery of new genes, alternative splicing and protein-protein interactions between intracellular processing of vitamin B12 or cobalamin (Cbl) highlights the importance of an MS interactome. The goal of this PhD project is to further characterize the interactions of MS with other potential partners in a so-called MS interactome. Our data confirm for the first time in human cells (HepG2 cells and fibroblasts from cblC and cblG patients) various interactions that were so far only described *in vitro* or in bacteria: MS with methionine synthase reductase (MSR), MS with MMACHC, and MMACHC with MMADHC. Our data also reveal novel interactions: MMADHC with MTR, MMADHC with MSR, MSR with MMACHC and MS with MAT isoforms. Moreover, our data show that the absence of MS or MMACHC disturbs the interactions involving the other members of the MS interactome. In summary, this study suggests that different steps of the intracellular processing of Cbl could occur in a large multiprotein complex composed of at least MS, MSR, MMACHC, MMADHC and MAT isoforms that would contribute to protect the rare and highly reactive Cbl from the cytoplasmic milieu.

Keywords: Cobalamin, methionine synthase, methionine synthase reductase, MMACHC, MMADHC

