



HAL
open science

Etude comparative des aspects cliniques et physiopathologiques des erreurs innées du métabolisme de la vitamine B12 en fonction de l'âge

Arnaud Wiedemann

► **To cite this version:**

Arnaud Wiedemann. Etude comparative des aspects cliniques et physiopathologiques des erreurs innées du métabolisme de la vitamine B12 en fonction de l'âge. Médecine humaine et pathologie. Université de Lorraine, 2023. Français. NNT : 2023LORR0043 . tel-04246521

HAL Id: tel-04246521

<https://theses.hal.science/tel-04246521>

Submitted on 17 Oct 2023

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

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



**UNIVERSITÉ
DE LORRAINE**

**BIBLIOTHÈQUES
UNIVERSITAIRES**

AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

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

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



UNIVERSITÉ
DE LORRAINE



Inserm



nutrition-génétique et exposition
aux risques environnementaux

BioSE



École Doctorale BioSE (Biologie-Santé Environnement) Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »
Par Arnaud Wiedemann

**Étude comparative des aspects cliniques et physiopathologiques
des erreurs innées du métabolisme de la vitamine B₁₂
en fonction de l'âge**

Le 04/05/2023

Membre du jury :

Président :

Pr Cyril Schweitzer PU-PH, EVAH EA 3450, Université de Lorraine

Rapporteurs :

Pr Jean-François Benoist PU-PH, Lyps(Sys)², EA 7357, Université Paris Saclay

Pr Régis Guieu PU-PH, unité INSERM u1263, Université d'Aix-Marseille

Examineurs :

Dr Cécile Acquaviva PH, UMR 5305, CNRS/UCBL, Université de Lyon

Pr Jean-Louis Guéant PU-PH, Unité INSERM u1256, Université de Lorraine, Directeur de thèse

Pr Abderrahim Oussalah PU-PH, Unité INSERM u1256, Université de Lorraine, Co-Directeur de thèse

Membres invités :

Pr François Feillet PU-PH, Unité INSERM u1256, Université de Lorraine

Pr Edward Quadros Professeur, SUNY Downstate Medical Center New York

UMR1256 INSERM – N-GERE

Nutrition-Génétique et Exposition aux Risques Environnementaux

9 avenue de la Forêt de Haye – Faculté de médecine

54505 VANDOEUVRE-LES-NANCY - FRANCE

Remerciements

Mes remerciements vont tout d'abord à Monsieur le **Professeur Jean-Louis Guéant**, Professeur à la Faculté de Médecine de l'Université de Lorraine, qui m'a ouvert les portes de l'unité INSERM U1256 il y a déjà de nombreuses années, tout d'abord par un SIR, puis un Master et enfin cette Thèse. Je le remercie pour sa disponibilité et sa confiance, dont j'espère avoir été à la hauteur. Son expérience, son savoir, son implication sans relâche au service de l'hôpital public et des patients qui est un modèle à suivre pour beaucoup sur le chemin hospitalo-universitaire.

Je remercie Monsieur le **Professeur Abderrahim Oussalah**, co-directeur de thèse, Professeur à la Faculté de Médecine de l'Université de Lorraine. Je le remercie sincèrement de son soutien et de son aide précieuse dans la réalisation de ce travail, pour sa disponibilité et son envie de transmettre son savoir au cours de nombreuses réunions à toute heure du jour et de la nuit, pour sa force de travail mise au service des patients.

Je remercie Monsieur le **Professeur Jean-François Benoist** d'avoir accepté d'être rapporteur de mon travail, ainsi que pour vos précieux enseignements. Je remercie également Monsieur le **Professeur Régis Guieu** d'avoir accepté d'être rapporteur de mon travail.

Je remercie Madame le **Docteur Cécile Acquaviva** et Monsieur le **Professeur Edward Quadros** pour avoir accepté d'examiner mes travaux.

Je remercie Monsieur le **Professeur Vincent Laugel**, dont l'aide apporté au cours des comités de suivi de thèse a été précieuse.

Je remercie également Monsieur le **Professeur Cyril Schweitzer** d'avoir accepté de faire partie de ce jury, ainsi que pour son accompagnement quotidien sur ce long chemin qu'est le chemin hospitalo-universitaire, au sein du pôle pédiatrique mais aussi aux lits des patients en réanimation et en pédiatrie.

Je remercie Monsieur le **Professeur François Feillet**, qui m'a accordé sa confiance depuis de longues années. J'espère être à la hauteur des attentes placées et de pouvoir moi aussi prendre en charge les patients avec son dévouement.

Je remercie chaleureusement l'ensemble des membres de l'unité INSERM u1256 avec qui j'ai pu échanger tout au long de ce travail de thèse. Je remercie tout particulièrement Monsieur le **Docteur David Coelho**, pour nos échanges, pour sa gentillesse, et son encadrement de Master, Monsieur le **Docteur Jean-Marc Alberto**, pour son savoir technique sans fond, Madame le **Docteur Céline Chéry** dont la gentillesse n'a d'égal que son engagement pour les malades, **Aurélie**, **Thomas** et **Justine** pour m'avoir accompagné et formé à la paillasse, **Ziad**, **Rashka**, **Youssef** et **Karim** pour leur aide dans ces travaux. Une pensée aussi pour **Caroline**, **Dominique**, **Aline** et **Catherine** et leur disponibilité sans faille.

Dédicaces

Je souhaite tout d'abord remercier du fond du cœur mon **Papa** et ma **Maman**, sans qui rien de tout cela ne serait possible. Je vous remercie pour votre patience, votre éducation, vos sacrifices, votre amour, les moments de partage qui m'ont permis de devenir l'homme que je suis aujourd'hui. J'espère que vous êtes fiers du chemin parcouru et vous dédie ce travail. Je vous aime fort.

Je remercie mes petites sœurs, **Éléonore** et **Émilie**, pour votre gentillesse, pour votre générosité, vos sourires et votre aide n'importe quand, n'importe où, vous êtes en or. Je remercie **Mamy Céline** pour son regard bienveillant du haut de toutes ses années et j'ai une pensée particulière pour **Papy Jean**, un modèle.

Je remercie l'équipe médicale avec qui je partage mon quotidien depuis quelques années, après des vagues Covid, des épidémies de bronchiolites et qui m'a permis de réaliser ces travaux. A **Florent** dont l'intransigeance, l'exigence et l'amitié m'ont poussées et permises d'être le réanimateur que je suis aujourd'hui. A **Nathan** travailleur acharné et décorateur d'intérieur de talent avec qui j'espère pouvoir encore échanger de nombreuses années. A **Matthieu** dont la connaissance sans limite donne une autre idée de l'infini. A **Noël** dont l'humeur constante, le dévouement aux malades et les compétences techniques sont inégalable. Aux jeunes qui arrivent et m'ont fait confiance : **Léa, Anne-Charlotte, Marie-Sophie, Constance, Claire (x2), Pauline, Marie (x2), Romane, Jérémie, Ariane, Coline, Camille, Elena, Justine (x2), Laura, Céline, Sylvie (x2), Caroline, Clémence, Nathalie, Jean-Philippe, Clémentine, Maurane, Maritie, Aurélien**. Et à ses juniors qui ont le courage de nous rejoindre **Pauline** et **Alizée**, votre courage vous honore. J'ai une pensée toute particulière pour mon **équipe paramédicale**, avec qui je partage aussi mes nuits, équipe 1 et équipe 2, vous êtes tous et toutes indispensables aux soins de nos patients, soyez sûr de mon attachement à chacun et chacune d'entre vous, jeunes comme moins jeunes. A tous les **pédiatres** de l'hôpital d'enfants, les **biochimistes**, les **réanimateurs**, les **diététiciennes** et **kinésithérapeutes**.

Je dédie ce travail à mes enfants, **Anna** et **Bastien**. Pour toutes les nuits passées loin de la maison, au chevet des autres enfants, ou à travailler sur divers projets. Pour tous vos sourires, vos câlins et ces merveilleux moments passés ensemble et encore à venir. Je vous aime.

A **Mathilde**, mon épouse, qui partage ma vie depuis 10 ans. Les jeunes internes que nous étions ont bien changé... Merci d'être là, merci d'être toi, merci pour nos enfants. Merci de supporter au quotidien les gardes, les repos de gardes, les coups de pression, la fatigue, les échecs. Merci de partager les réussites, et celle-là, elle sent un peu le sirop d'érable. Je t'aime.

*Aux enfants,
aux miens,*

*à tous ceux
dont la charge m'a été confiée,
De leurs premiers souffles,
Jusqu'au dernier parfois,
Que j'en sois à la hauteur*

Publications dans les revues à comité de lecture en lien avec la thèse sur la période 2019-2022.

Wiedemann A., Oussalah A., Lamireau N., Théron M., Julien M., Mergnac, J.P., Augay B., Deniaud P., Alix T., Frayssinoux M., Feillet F., Guéant J.-L. *Clinical, Phenotypic and Genetic Landscape of Patients With Genetically Proven Inherited Disorders of Vitamin B12 Metabolism: Results From an Individual Case Report Meta-Analysis and Phenome-Wide Association Study on 824 Patients*. **Cell Report Med**. 2022 Jul 19;3(7):100670. (Ranking **A**).

Matmat K., Guéant-Rodriguez RM., Oussalah A., **Wiedemann-Fodé A.** ..., Conart J.B., *Ocular manifestations in patients with inborn errors of intracellular cobalamin metabolism: a systematic review*. **Hum Genet**. 2021 Oct 15. (Ranking **C**)

Mergnac J.-P., **Wiedemann A**, Chery C, Ravel J.-M., Namour F., Guéant J.-L., François Feillet F., Oussalah A, *Diagnostic yield of clinical exome sequencing as a first-tier genetic test for the diagnosis of genetic disorders in pediatric patients: results from a referral center study*. **Hum Genet**. 2021 Sep 8. (Ranking **C**)

Wiedemann A, Chery C, Coelho D, (...) Oussalah A. Mutations in MTHFR and POLG impaired activity of the mitochondrial respiratory chain in 46-year-old twins with spastic paraparesis. **J Hum Genet**. 2020 Jan;65(2):91-98. (Ranking **C**)

Ghemrawi R, Arnold C, Battaglia-Hsu SF, (...), **Wiedemann A**, (...), Coelho D. *SIRT1 activation rescues the mislocalization of RNA-binding proteins and cognitive defects induced by inherited cobalamin disorders*. **Metabolism**. 2019 Dec (Ranking **B**)

Autres Publications sur la période 2019-2022.

Moskwa R., Todeschi J., **Wiedemann A.**, Stella I., Joud A., Klein O., *Ophthalmological lesions in shaken baby syndrome: A retrospective analysis of 133 consecutive cases (1992-2018)*. **Neurochirurgie**. 2022 Feb 9;S0028-3770(22)00036-4 (Ranking **E**).

Joud A., Sindou M., Stella I., **Wiedemann A.**, Klein O., Dorsal rhizotomy in cerebral palsy: How root sectioning is influenced by intraoperative neuromonitoring? **Neurochirurgie**. 2022 Feb 9;S0028-3770(22)00037-6 (Ranking **E**).

Wiedemann A., Chunru L., Oussalah A., ... , Feillet F., [A long non-coding RNA regulates the activity of phenylalanine hydroxylase, the key enzyme of phenylketonuria]. **Med Sci (Paris)**. 2022 Jan;38(1):12-14. (Ranking **E**)

Ouldali N., Toubiana J., Antona D., Javouhey E., ..., **Wiedemann A.**, ..., Belot A., Angoulvant F., French Covid-19 Paediatric Inflammation Consortium. *Association of Intravenous Immunoglobulins Plus Methylprednisolone vs Immunoglobulins Alone With Course of Fever in Multisystem Inflammatory Syndrome in Children*. **JAMA**. 2021 Mar 2;325(9):855-864. (Ranking **A+**)

Contou D., Colin G., Travert B., ... , **Wiedemann A.**, ..., Tristant A., Nicolas de Prost N. , French m-TSS Study Group. *Menstrual toxic shock syndrome: a French nationwide multicenter retrospective study*. **Clin Infect Dis**. 2021 Apr 27. (Ranking **A**)

Kok G., Tseng L., Schene I.F. , ... **Wiedemann A.**, ..., Karnebeek C., Fuchs S., *Treatment of ARS deficiencies with specific amino acids*. **Genet Med** 2021 Nov;23(11):2202-2207. (Ranking **A**)

Ouldali N., Dawei Yang D, Madhi F, Levy M, ..., **Wiedemann A.**, ..., Gajdos V, Angoulvant F, investigator group of the PANDOR study, *Factors Associated With Severe SARS-CoV-2 Infection*. **Pediatrics**. 2020 (Ranking **A**)

Guenver C., Oualha M., Levy C., ..., **Wiedemann A.**, ..., Ouldali N., *Educational Setting and SARS-CoV-2 Transmission Among Children With Multisystem Inflammatory Syndrome: A French National Surveillance System*. **Front Pediatr**. 2021 Oct 26;9:745364. (Ranking **B**)

Ravel JM., Dreumont N., Mosca P., ..., **Wiedemann A.**, ..., Feillet F., *A bi-allelic loss-of-function SARS1 variant in children with neurodevelopmental delay, deafness, cardiomyopathy, and decompensation during fever*. **Hum Mutat**. 2021 Dec;42(12):1576-1583. (Ranking **B**)

Castiglioni C., Feillet F., Barnerias C., **Wiedemann A.**, ..., Serrano M., *Expanding the phenotype of X-linked SSR4-CDG: Connective tissue implications*. **Hum Mutat**. 2021 Feb;42(2):142-149. (Ranking **B**)

Alesandrini M., Hauet M, Dezavelle S., Maria M., Borsa-Dorion A., Gatin A., Schweitzer C., **Wiedemann A.**, How do the FIFA World Cup 2018 and the 2016 UEFA championships impact a pediatric emergency department? **Arch Pediatr**. 2021 Apr;28(3):234-237. (Ranking **E**)

Staufner C, Peters B, Wagner M, (...) **Wiedemann A.**, (...), Lenz D. Defining clinical subgroups and genotype-phenotype correlations in NBAS-associated disease across 110 patients. **Genet Med**. 2020 Mar;22(3):610-621. (Ranking **A**)

Rice GI, Park S, Gavazzi F, (...) **Wiedemann A.**, (...), Crow YJ. Genetic and phenotypic spectrum associated with IFIH1 gain-of-function. **Hum Mutat**. 2020 Apr;41(4):837-849. (Ranking **B**)

Bérat C.M.*, Montealegre S.*, **Wiedemann A.**, Le Corronc Nuzum M., [...] Maltret A., de Lonlay P. Clinical and biological characterization of 20 patients with TANGO2 deficiency indicates novel triggers of metabolic crises and no primary energetic defect. **J Inherit Metab Dis**. 2020 Sep 14. (* first co-author) (Ranking **B**)

Wiedemann A, Renard E, Molin A, Weryha G, Oussalah A, Guéant JL, Feillet F. Prolonged 25-OH Vitamin D Deficiency Does Not Impair Bone Mineral Density in Adult Patients With Vitamin D 25-Hydroxylase Deficiency (CYP2R1). **Calcif Tissue Int.** 2020 May 19. (Ranking **C**)

Weinhard S., **Wiedemann A.**, Leheup B., Dalle J.-H., Lebon Labich B., Pochon C. Pubertal outcomes of children transplanted with allogeneic stem cells after myeloablative total body irradiation or busulfan: Influence of age and sex is confirmed, while a role of chronic graft-versus-host disease in delayed puberty onset is revealed. **Pediatr Transplant.** 2020 Sep;24(6):e13773. (Ranking **D**)

Wiedemann A., Oussalah A., Jeannesson E., Guéant J.-L., Feillet F., [Phenylketonuria, from diet to gene therapy]. **Med Sci (Paris).** Aug-Sep 2020;36(8-9):725-734. (Ranking **E**)

Besnard T, Sloboda N, Goldenberg A, (...) **Wiedemann A**, (...), Isidor B. *Biallelic pathogenic variants in the lanosterol synthase gene LSS involved in the cholesterol biosynthesis cause alopecia with intellectual disability, a rare recessive neuroectodermal syndrome.* **Genet Med.** 2019 Feb 6. (Ranking **A**)

Sloboda N, **Wiedemann A**, Merten M, Alqahtani A, Jeannesson E, Blum A, Henn-Ménétré S, Guéant JL, Renard E, Feillet F. Efficacy of low dose nitisinone in the management of alkaptonuria. **Mol Genet Metab.** 2019 Jul;127(3):184-190. (Ranking **C**)

Tables des matières :

Préambule	- 1 -
1 Partie 1 : Introduction	- 5 -
1.1 Monocarbone, folates et vitamine B₁₂	- 7 -
1.1.1 Généralités	- 7 -
1.1.2 Méthylation	- 7 -
1.1.3 Métabolisme énergétique	- 9 -
1.1.4 Folates	- 12 -
1.1.4.1 Structure chimique	- 12 -
1.1.4.2 Histoire	- 14 -
1.1.4.3 Nutrition et apport	- 14 -
1.1.4.4 Rôles des folates	- 16 -
1.1.5 Vitamine B ₁₂	- 17 -
1.1.5.1 Structure chimique	- 17 -
1.1.5.2 Histoire	- 18 -
1.1.5.3 Apports journaliers recommandés	- 19 -
1.1.5.4 Rôles de la vitamine B ₁₂	- 20 -
1.2 Métabolisme des monocarbone	- 21 -
1.2.1 Métabolisme des folates	- 21 -
1.2.1.1 Absorption	- 21 -
1.2.1.2 Transport	- 22 -
1.2.1.3 Stockage et élimination	- 23 -
1.2.2 Métabolisme de la vitamine B ₁₂	- 23 -
1.2.2.1 Absorption	- 23 -
1.2.2.2 Transport	- 24 -
1.2.2.3 Métabolisme intracellulaire	- 25 -
1.2.2.4 Stockage et élimination	- 27 -
1.2.3 Le cycle de la méthionine	- 28 -
1.2.3.1 Cycle SAM/SAH	- 28 -
1.2.3.2 Métabolisme de l'homocystéine - Transsulfuration	- 30 -
1.3 Erreurs innées du métabolisme de la vitamine B₁₂	- 31 -
1.3.1 La carence en vitamine B ₁₂	- 31 -
1.3.2 Troubles de l'absorption	- 31 -
1.3.3 Conséquence physiopathologique d'une carence en vitamine B ₁₂	- 31 -
1.3.4 Généralités sur les erreurs innées du métabolisme	- 33 -
1.3.5 Défauts génétiques de l'absorption intestinale de la vitamine B ₁₂	- 37 -
1.3.5.1 Déficit du facteur intrinsèque	- 37 -
1.3.5.2 Syndrome d'Imerslund-Gräsbeck	- 38 -
1.3.6 Déficit du transport de la vitamine B ₁₂	- 38 -
1.3.6.1 Déficit en haptocorrine	- 38 -
1.3.6.2 Déficit en transcobalamine	- 39 -
1.3.6.3 Déficit du récepteur de la transcobalamine (CD320)	- 40 -
1.3.7 Déficit du métabolisme intracellulaire affectant la voie de synthèse de la méthylcobalamine et de l'adénosylcobalamine	- 41 -
1.3.7.1 Anomalies de la sortie du lysosome	- 41 -
1.3.7.2 MMACHC – groupe de complémentation cblC	- 43 -
1.3.7.3 Épimutation du gène MMACHC - Epi-cblC	- 45 -
1.3.7.4 Anomalies de régulation du gène MMACHC – cblX/cblK	- 47 -
1.3.7.5 MMADHC – groupe de complémentation cblD-MMA/HC	- 48 -
1.3.8 Déficit du métabolisme intracellulaire affectant sélectivement la voie de synthèse de la méthylcobalamine	- 51 -
1.3.8.1 Méthionine synthase et Méthionine synthase réductase – groupes de complémentation cblG et cblE	- 51 -

1.3.8.2	MMADHC - groupe de complémentation cbID-HC	- 53 -
1.3.9	Déficit du métabolisme intracellulaire affectant sélectivement la voie de synthèse de l'adénylcobalamine	- 54 -
1.3.9.1	Acidurie méthylmalonique isolée par mutations des gènes MMUT, MMAA ou MMAB - groupe de complémentation respectif : mut, cblA et cblB	- 54 -
1.3.9.2	MMADHC - groupe de complémentation cbID-MMA	- 57 -
1.4	Objectifs de la thèse	- 59 -
2 Partie 2 : Méta-analyse sur données individuelles – Description clinique, phénotypique et génétique de 824 patients rapportés dans la littérature avec un déficit du métabolisme intracellulaire de la vitamine B₁₂ génétiquement documenté.		
- 61 -		
2.1	Introduction	- 63 -
2.2	Matériels et méthodes	- 64 -
2.2.1	Requête électronique de recherche systématique	- 64 -
2.2.2	Sélection des articles	- 67 -
2.2.3	Extraction des données	- 67 -
2.2.4	Objectifs de l'étude	- 68 -
2.2.5	Données analysées	- 69 -
2.2.6	Sélection des gènes pour former les clusters fonctionnels	- 69 -
2.2.7	Synthèses et analyses des datas	- 70 -
2.3	Résultats	- 71 -
2.3.1	Revue de la littérature	- 71 -
2.3.2	Description des 824 patients rapportés avec une erreur innée du métabolisme de la vitamine B ₁₂	- 71 -
2.3.3	Description phénotypique des maladies héréditaires du métabolisme de la vitamine B ₁₂ et marqueurs prédictifs associés.	- 92 -
2.3.4	Phénotypes des troubles héréditaires du métabolisme de la vitamine B ₁₂ selon les groupes fonctionnels de gènes et marqueurs prédictifs associés	- 99 -
2.3.4.1	Cluster de gènes « Transport cytoplasmique »	- 99 -
2.3.4.2	Cluster fonctionnel de gènes « Mitochondrie »	- 100 -
2.3.4.3	Cluster fonctionnel de gènes « Biodisponibilité B ₁₂ »	- 106 -
2.3.4.4	Cluster fonctionnel de gènes « Reméthylation »	- 106 -
2.3.5	Anomalies métaboliques associées à la survenue d'une anémie, de manifestations neurologiques, des deux ou d'aucune des deux	- 109 -
2.3.6	Facteurs prédictifs de mortalité	- 109 -
2.4	Discussion	- 118 -
3 Partie 3 : Évaluation d'un panel NGS pour le diagnostic des patients pris en charge au centre de référence pédiatrique des erreurs innées du métabolisme du C.H.R.U. de Nancy - 129 -		
3.1	Préambule	- 130 -
3.1.1	Séquençage de nouvelles générations	- 130 -
3.1.1.1	Technique de séquençage	- 130 -
3.1.1.2	Marqueurs qualités	- 131 -
3.1.2	Classification des variants	- 133 -
3.1.3	Applications pratiques du NGS	- 133 -
3.2	Objectifs de l'étude n°2	- 134 -
3.3	Introduction de l'étude n°2	- 135 -
3.4	Matériels et méthodes	- 136 -
3.4.1	Cadre français pour le diagnostic et la prise en charge des maladies génétiques	- 136 -
3.4.2	Conception de l'étude et critères de sélection des patients	- 136 -

3.4.3	Données recueillies pour l'étude	- 137 -
3.4.4	Séquençage de nouvelle génération (NGS).....	- 137 -
3.4.5	Classification des patients selon les résultats du séquençage NGS	- 139 -
3.4.6	But de l'étude.....	- 139 -
3.4.7	Analyses statistiques	- 139 -
3.5	Résultats	- 140 -
3.5.1	Population étudiée	- 140 -
3.5.2	Résultats du CES sur toute la cohorte (Table 19)	- 140 -
3.5.3	Rendement diagnostique du CES en fonction des sous-groupes de maladies.....	- 142 -
3.5.3.1	Groupe 1 : Ostéogenèse imparfaite.....	- 142 -
3.5.3.2	Groupe 2 : Maladie métabolique avec résultats biologiques évocateurs.....	- 142 -
3.5.3.3	Groupe n°3 : Dyslipidémie	- 143 -
3.5.3.4	Groupe n° 4 : Troubles neurologiques	- 143 -
3.5.3.5	Groupe n° 5 : Autres pathologies.....	- 144 -
3.6	Discussion	- 153 -
4	<i>Partie 4 : Les altérations de l'expression et des modifications post-transcriptionnelles des enzymes impliquées dans le métabolisme énergétique et celui des acides aminés contribuent à la variabilité clinique et métabolique des erreurs innées du métabolisme de la cobalamine de type cblC/epi-cblC.....</i>	- 173 -
4.1	Conséquences cellulaires d'un défaut de vitamine B₁₂	- 175 -
4.1.1	Généralités	- 175 -
4.1.2	Un déficit en vitamine B ₁₂ responsable d'un stress oxydant.....	- 175 -
4.1.2.1	Généralités sur le stress oxydant.....	- 175 -
4.1.2.2	Vitamines B ₁₂ et stress oxydant	- 176 -
4.1.2.3	Le stress oxydant dans les erreurs innées du métabolisme de la vitamine B ₁₂	- 177 -
4.1.3	Stress du réticulum endoplasmique causé par une diminution de synthèse de SIRT1	- 179 -
4.1.3.1	Stress du réticulum endoplasmique et Unfolded Protein Response.....	- 179 -
4.1.3.2	Diminution de la synthèse de Sirtuin 1 responsable d'une hyperacétylation d'HSF1	- 181 -
4.1.4	Altération de la voie PGC-1 α par une diminution d'expression de SIRT1	- 183 -
4.1.5	Anomalie de localisation des RNA Binding Protein due à un déficit en cobalamine.....	- 184 -
4.1.5.1	Généralités sur les RNA Binding Protein (RBP)	- 184 -
4.1.5.2	Human antigen R (HuR)	- 185 -
4.1.5.3	Effets d'un déficit en vitamine B ₁₂ sur les RBP, dont HuR	- 186 -
4.1.5.4	L'altération d'HuR entraîne la diminution de synthèse de la sirtuine SIRT1.....	- 187 -
4.1.6	Conséquences moléculaires, cellulaires et tissulaires.....	- 188 -
4.1.6.1	Effets sur les gènes : méthylation de l'ADN	- 190 -
4.1.6.2	Effets sur la synthèse protéique	- 191 -
4.1.6.3	Effet sur les modifications post-traductionnelles (PTM).....	- 191 -
4.1.6.4	Conséquences sur la prolifération cellulaire.....	- 193 -
4.1.7	Effets d'une carence en vitamine B ₁₂ sur le développement in utéro	- 194 -
4.1.7.1	Fetal programming	- 194 -
4.1.7.2	Anomalie de développement embryonnaire	- 195 -
4.1.8	Apport des sciences omiques dans la compréhension physiopathologique.....	- 196 -
4.1.8.1	Génomique.....	- 197 -
4.1.8.2	Transcriptomique.....	- 197 -
4.1.8.3	Protéomique	- 198 -
4.1.8.4	Métabolomique	- 198 -
4.2	Objectifs de l'étude n°3	- 199 -

4.3	Introduction de l'étude n°3	- 200 -
4.4	Matériels et méthodes	- 202 -
4.4.1	Patients, fibroblastes de patient et culture cellulaire.	- 202 -
4.4.2	Analyses du métabolome	- 203 -
4.4.3	Analyses transcriptomiques par RNA-Seq.	- 204 -
4.4.4	Analyses protéomiques.	- 204 -
4.4.5	Analyses bioinformatiques pour l'étude de transcriptomique.	- 205 -
4.4.6	Analyse bioinformatique des données protéomiques pour déchiffrer les PTM.	- 205 -
4.5	Résultats.	- 206 -
4.5.1	Présentation clinique et métabolique des patients.	- 206 -
4.5.1.1	Description détaillée des cas cliniques.....	- 207 -
4.5.1.2	Chromatographie des acides aminés plasmatiques détaillée des patients	- 212 -
4.5.2	Étude métabolomique.....	- 215 -
4.5.3	Étude transcriptomique : Identification des gènes différentiellement exprimés des enzymes métaboliques (Table 24).	- 219 -
4.5.4	Étude protéomique : Identification des enzymes métaboliques différentiellement exprimées (Table 26).	- 228 -
4.5.5	Modifications post-traductionnelles (Table 28).	- 241 -
4.6	Discussion	- 250 -
5	Discussion générale.....	- 257 -
6	Articles publiés.....	- 261 -
6.1	Etude n1 – Méta-Analyse – Cell Report Medicine (IF 16.988)	- 261 -
6.2	Etude n2 – NGS – Human Genetics (IF 6.099)	- 287 -
6.3	Etude n3 - PTM – soumis E-Biomedecine (IF 11.205)	- 297 -

Abréviations

ATP	Adénosine-Triphosphate
10-FormylTHF	10-Formyltétrahydrofolate
4-HNE	4-hydroxy-2-nonéanal
5-AZA	5-azacytidine
95% CI	Intervalle de confiance à 95%
AAF	Fréquence allélique alternative
ABCD4	Adenosine triphosphate-binding cassette subfamily D member
ABCG	ATP-binding cassette type G
ACMG	American College of Medical Genetics and Genomics
AD	Autosomique dominant
ADN	Acide désoxyribonucléique
AdoCbl	5'- désoxyadénosylcobalamine
ADP	Adénosine-Diphosphate
AHCY	Adénosyl-homocystéine-hydrolase
AICART	Aminoimidazolecarboxamide ribonucleotide formyltransferase
AR	Autosomique récessif
ARNm	Acide ribonucléique messenger
AS	Apport satisfaisant
BNM	Besoin nutritionnel moyen
Ca ²⁺	Ion calcium
Cbl	Cobalamine
CBS	Cystathionine β-synthase
CES	Exome clinique
CnCbl	Cyanocobalamine
CoA	Co-enzyme A
cpm	Comptes par million
DHF	Dihydrofolates
DMB	Diméthylbenzimidazole
dTMP	Deoxythymidine monophosphate
dUMP	Deoxyuridine monophosphate
EEG	Electroencéphalogramme
ELAV1	ELAV Like RNA Binding Protein 1
EMG	Électromyogramme
ERSE	Endoplasmic Reticulum Stress response Element
ESHG	European Society of Human Genetic
FADH ₂	Flavine Adénine Dinucléotide
FDR	False Discovery Rate
FGCP	Folylpolyglutamate carboxypeptidase
FI	Facteur intrasèque
FPGS	Folylpoly-γ-glutamate synthetase
FR	Récepteur aux folates

GART	Glycinamide ribonucleotide transformylase
GH	γ -glutamyl hydrolase
GLDC	Glycine décarboxylase
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GSH	Glutathion
Hcy	Homocystéine
HF1	Host factor 1
HGVS	Human Genome Variation Society
HHcy	Hyperhomocystéinémie
HSP	Heat Shock Proteins
HuR	Antigène humain R
IECM	Erreurs innées du métabolisme cellulaire de la Cbl
IQR	Ecart interquartile
IRM	Imagerie par résonance magnétique
ko	Knock-out
LC-MS/MS	Chromatographie en phase liquide-spectrométrie de masse
LMBD1	Lipocalin-1-interacting membrane receptor domain-containing-1
LSS	Limite supérieure de sécurité
MAT	Methionine Adenosyl Transferase
MCAD	Acyl-CoA déshydrogénase à chaîne moyenne
<i>MCEE</i>	Methylmalonyl-CoA epimerase
MCM	Methylmalonyl-CoA mutase
MDA	Malondialdéhyde cancérigène
MeCbl	Méthylcobalamine
MeSH	Medical Subject Headings
MHM	Maladies héréditaires du métabolisme
MMA	Acide méthylmalonique
MMAA	Methylmalonic aciduria cblA type
MMAB	Methylmalonic aciduria cblB type
MMACHC	Methylmalonic aciduria cblC type with homocystinuria
MMADHC	Methylmalonic aciduria cblD type with homocystinuria
MOOSE	Meta-analysis Of Observational Studies in Epidemiology
MRP1	Multidrug resistance protein 1
MS	méthionine synthase
MSR	Méthionine synthase reductase
MTHFR	Méthylène tétrahydrofolate réductase
MUT	Methylmalonyl-CoA mutase
N5-MeTHF	5-Méthyltetrahydrofolate
N5,10-MeTHF	5,10- Méthylenetetrahydrofolate
NADH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide
NGS	Séquençage de nouvelles générations
OHcbl	Hydroxocobalamine
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man

OMS	Organisme mondial de la santé
OR	Odd ratio
p-ABA	Acide para-aminobenzoïque
PCC	Propionyl CoA carboxylase
PCFT1	Proton-coupled folate transporter
PGC-1a	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha
pH	Potentiel hydrogène
Pi	Phosphore
PP2A	Protéine phosphatase 2
ppm	Particules par million
PTM	Modification post-traductionnelle
RBP	RNA Binding Protein
RE	Reticulum endoplasmique
RFC	Reduced folate carrier
RMN	Résonance magnétique nucléaire
RNP	Référence nutritionnelle pour la population
ROS	Reactive oxygen species
RT-PCR	Reverse transcriptase polymerase chain reaction
S-FBP	Folate Binding Proteins Solubles
SAH	S-adénosine-L-Homocystéine
SAM	S-adénosyl-L-méthionine
SAMS	S-adénosyl-L-méthionine synthetase
SDS-PAGE	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodecylsulfate de sodium
SHMT	serine hydroxymethyltransferase
SIRT1	Sirtuin 1
SUCLG	Succinate-CoA ligase
TCA	Acide tricarboxylique
TCbIR	Récepteur de la transcobalamine
TCI	Haptocorrine
TCII	Transcobalamine II
THF	Tetrahydrofolate
tRNA	Acide ribonucléique de transfert
TYMS	Thymidylate synthase
UPR	Unfolded Protein Response
XL	Lié à l'X
XLD	Dominant lié à l'X
XLR	Récessif lié à l'X

Préambule

« Quel est le point commun entre un nouveau-né en coma hyperammonémique deux jours après sa naissance, un nourrisson d'un mois ayant une anémie mégalo-blastique profonde avec une hypertension pulmonaire sévère, un enfant de 4 ans sans antécédent avec une perte des acquisitions et une atrophie cérébrale et un homme de 40 ans ayant une thrombose veineuse profonde récidivante ? » A priori pas grand-chose, l'âge des patients est différent, les manifestations cliniques touchent des organes différents également, il ne semble pas y avoir de lien étiopathogénique commun. Et pourtant, les quatre patients souffrent d'une anomalie du métabolisme intracellulaire de la vitamine B₁₂.

Dès la fin du XIX^e siècle, les conséquences d'une carence en vitamine B₁₂ sont documentées avec la description de l'anémie dite « pernicieuse » par Addison et Biermer (1). Le premier patient décrit comme ayant un déficit du métabolisme intracellulaire date de 1969. Ce jeune patient présentait un tableau neurologique sévère associé à une hyperhomocystéinémie et une acidémie méthylmalonique responsable d'un décès à 8 semaines de vie (2). En près de 150 ans, après 5 prix Nobel, la vitamine B₁₂ et les pathologies liées à un défaut de son métabolisme sont loin d'avoir livré tous leurs secrets. En effet, plusieurs questions restent sans réponse : 1) Comment expliquer une telle variation du phénotype clinique entre les 4 patients décrits en amont pour un même groupe d'altération métabolique, à fortiori s'il s'agit de la même altération enzymatique à l'origine de ces troubles ; 2) Comment expliquer la différence des expressions phénotypiques selon l'âge du patient ? 3) Existe-t-il un substratum moléculaire à l'échelle génomique et/ou post-génomique à l'origine de la variabilité de l'expression phénotypique chez les patients atteints d'une erreur innée du métabolisme de la vitamine B₁₂ ?

Depuis la fin des années 1990, les maladies rares sont devenues un enjeu de santé publique en France, aboutissant à la création de différents plans nationaux avec un slogan désormais emblématique, repris par la presse généraliste : « **Les maladies sont rares, mais comme elles sont plus de 7 000, les malades sont nombreux !** ». Par définition, une maladie est considérée comme rare lorsqu'elle concerne moins de 1/2 000 personnes. Toutes maladies rares confondues, on estime que 263 à 446 millions de personnes sont touchées dans le monde, ce qui correspond à une

prévalence dans la population mondiale de 3,5 à 5,9 % (3). En France, ces patients seraient au nombre de 3 millions. Près de 80 % des maladies rares sont d'origine génétique, et plus de 70 % d'entre elles ont une expression clinique dès l'enfance, ce qui fait des pédiatres les premiers praticiens à être confronté à ces maladies (4). Un patient sur 2 reste encore de nos jours sans diagnostic précis, et seulement 10% d'entre eux peuvent accéder à un traitement curatif.

Les erreurs innées du métabolisme de la vitamine B₁₂ sont un groupe de maladies rares. Les patients présentent une grande variabilité de signes cliniques, différents selon l'âge d'apparition et le gène responsable de la maladie. En effet plus d'une dizaine de protéines sont impliquées dans l'internalisation de la vitamine B₁₂ et ses transports intracellulaire, cytoplasmique et mitochondrial, aboutissant à la synthèse des deux isoformes actives de la vitamine B₁₂ : la méthylcobalamine et l'adénosylcobalamine qui interviennent respectivement dans les processus de méthylation et le métabolisme énergétique.

L'objet de ce travail de thèse, réalisé au sein de l'unité INSERM UMR_S 1256 NGERE (Nutrition Génétique et Exposition aux Risques Environnementaux), est de décrire et définir les phénotypes cliniques présentés par les patients ayant un déficit du métabolisme intracellulaire de la vitamine B₁₂, en fonction des variants géniques et de l'âge d'apparition des symptômes, et de les mettre en lien avec les pathomécanismes secondaires à l'altération du métabolisme de la B₁₂.

Le présent manuscrit rapporte les résultats de mon travail de thèse d'université intitulé : « **Étude comparative des aspects cliniques et physiopathologiques des erreurs innées du métabolisme de la vitamine B₁₂ en fonction de l'âge** ».

La première partie du manuscrit reprend les connaissances actuelles relatives au métabolisme de la vitamine B₁₂ et de façon plus globale celui des monocarbone dans lequel il s'imbrique avec une description des mécanismes métaboliques intracellulaire. avant de décrire les maladies connues en lien avec un déficit du métabolisme intracellulaire de vitamine B₁₂ pour conclure par les objectifs de la thèse.

La deuxième partie de ce travail est la réalisation d'une méta-analyse sur données individuelles de l'ensemble des cas de patients rapportés dans la littérature, ayant un déficit du métabolisme de la vitamine B₁₂ génétiquement documenté. Ce

travail exhaustif permettra une description générale de ces maladies et une catégorisation de leur expression clinique.

La troisième partie, comprend une brève description initiale des principes de fonctionnement des techniques de séquençage à haut débit, puis rapporte la rentabilité diagnostique d'un exome clinique au sein d'une population pédiatrique consultant auprès d'un centre de référence des erreurs innées du métabolisme.

Dans la quatrième partie, nous rapporterons dans un premier temps les connaissances actuelles sur les altérations moléculaires et cellulaires induites par un déficit de la vitamine B₁₂. Puis dans un second temps, nous étudierons par une approche d'analyse bio-informatique, les données du transcriptome, du protéome, du métabolome et des modifications post-traductionnelles issues de fibroblastes de patients pour la maladie la plus fréquente : le déficit en methylmalonic aciduria and homocystinuria type C (MMACHC, correspondant au groupe de complémentation *cb/C*). Nous nous intéresserons plus particulièrement aux altérations sur des enzymes d'autres voies métaboliques, qui lors d'un déficit sont responsables de manifestations cliniques similaires à celle observées dans les erreurs innées du métabolisme de la vitamine B₁₂.

L'ensemble de ce travail permettra de mieux définir les manifestations cliniques observées dans le cadre de pathologies dues à une anomalie du métabolisme de la vitamine B₁₂, et de les mettre en lien avec des mécanismes physiopathologiques génomiques et post-génomique éclairant ces manifestations sous un œil nouveau. Une meilleure connaissance de ces maladies permettra d'avancer vers une prise en charge thérapeutique novatrice.

1 Partie 1 : Introduction.

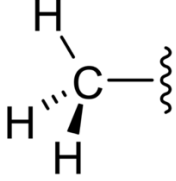
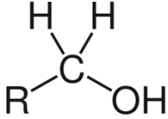
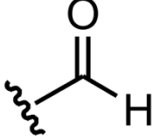
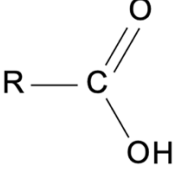
1.1 Monocarbones, folates et vitamine B₁₂

1.1.1 Généralités

Les radicaux monocarbonés sont un ensemble de molécules défini sur un plan biochimique par un unique atome de carbone dans un état d'oxydation variable (5). Les groupements monocarbonés ont vocation à être transportés d'un substrat chimique vers un autre via une réaction enzymatique. On peut citer les groupements méthyle -CH₃ ; hydroxyméthyle -CH₂OH ; formyle -CHO et carboxyle -COOH (**Table 1**).

Table 1. Différents radicaux monocarbonés.

Représentation graphique selon la nomenclature internationale.

Méthyle - CH ₃	
Hydroxyméthyle -CH ₂ OH	
Formyle -CHO	
Carboxyle -COOH	

1.1.2 Méthylation

La méthylation est un processus « simple » permettant le passage d'un groupement méthyle d'une molécule à l'autre. Il s'agit d'un processus indispensable à la vie humaine. Il est en effet nécessaire à la modulation de l'expression des gènes, la

modification de la conformation tridimensionnelle d'une protéine ou la synthèse de neurotransmetteurs par exemple.

Ce processus de méthylation serait impossible sans un acide aminé essentiel : la méthionine, qui porte un groupe méthyle. La méthionine interagit avec une molécule d'ATP (Adénosine-Triphosphate) pour former la S-adénosyl-L-méthionine (SAM). Cette réaction, catalysée par la SAM synthétase (SAMS), est une réaction de substitution nucléophile au niveau de l'atome de soufre de la méthionine (**Figure 1**).

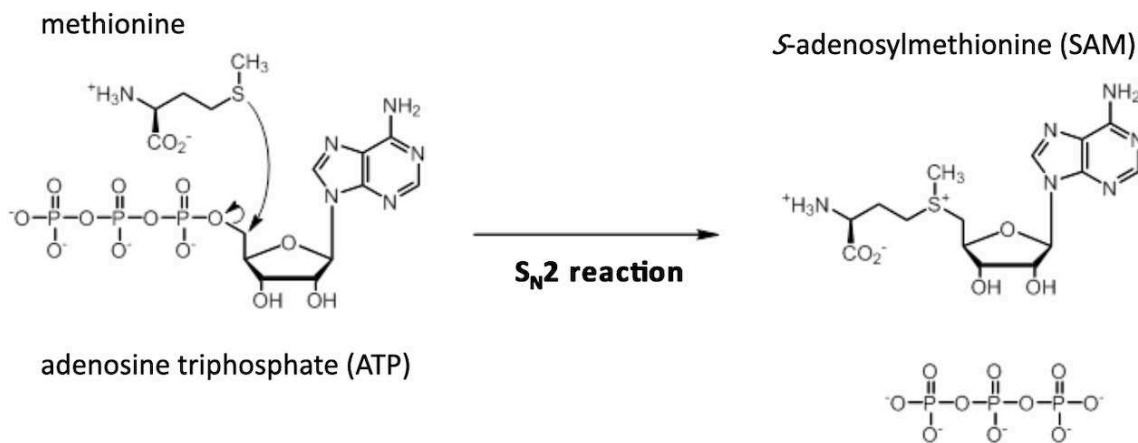


Figure 1. Synthèse de SAM. Transfert d'une méthionine sur une molécule d'ATP, permettant la synthèse de SAM et d'atome de Pi. Réaction catalysée par la SAMS.

La SAM ainsi formée est le principal donneur de groupe méthyle pour l'organisme. Environ 4/5^e des processus de méthylation sont impliqués dans la synthèse de créatine et de phosphatidylcholine, molécules indispensables à l'activité cérébrale. Les 20% restant sont dévolus aux nombreuses réactions de méthylation dans le corps humain.

Une fois le groupement méthyle transmis à une autre molécule, la SAM devient une molécule de SAH (S-adénosine-L-Homocystéine), qui est dégradée en homocystéine, un autre acide aminé. La resynthèse de méthionine à partir de l'homocystéine est une réaction chimique consistant à « réimplanter » un groupement méthyle sur cette molécule d'homocystéine. Cette réaction est possible via deux voies métaboliques, dont la principale est dépendante du métabolisme des folates et de la vitamine B₁₂.

1.1.3 Métabolisme énergétique

Le métabolisme énergétique correspond aux différentes réactions permettant la production d'énergie. On parle de phosphorylation oxydative. Au cours de ces réactions, les électrons à haut potentiel énergétique libérés par différentes réactions d'oxydation sont transférés à des atomes d'oxygène tout en produisant de l'énergie. Cette énergie est utilisée pour synthétiser des molécules d'ATP. Au sein des cellules du corps humain, ces différentes étapes sont réalisées par la chaîne respiratoire mitochondriale (6) (**Figure 2**). La chaîne respiratoire est constituée de plusieurs protéines localisées au sein de la membrane interne des mitochondries. Grâce à des co-enzymes sous forme réduite, tel que le NADH (Nicotinamide Adénine Dinucléotide) et le FADH₂ (Flavine Adénine Dinucléotide), il est créé un gradient de concentration de protons de part et d'autre de la membrane interne de la mitochondrie. La différence de concentration qui en résulte, constitue une force motrice électro-chimique permettant la phosphorylation de l'ADP en ATP grâce à l'ATP synthase (complexe V).

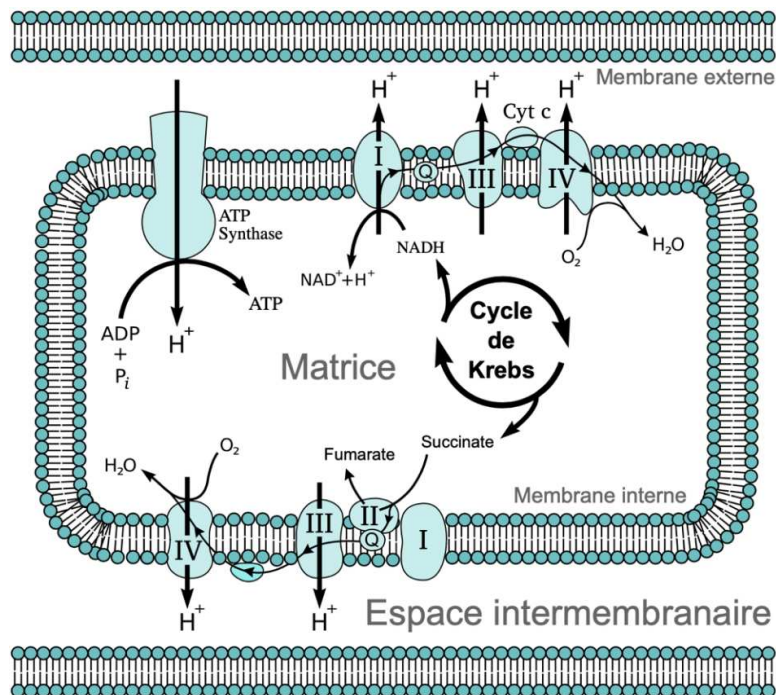


Figure 2. Principe de fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale.

Dans les cellules eucaryotes, la chaîne respiratoire est constituée de 4 ensembles protéiques au niveau de la membrane interne de la mitochondrie. Elle crée un gradient électro-chimique de protons entre la matrice et l'espace intermembranaire, qui sert de moteur à l'ATP synthase (complexe V), permettant la synthèse d'ATP.

La chaîne respiratoire nécessite une intégrité protéique pour fonctionner, mais également l'apport de cofacteurs (NADH et FADH₂) dans leur forme réduite. Le couple NAD⁺/NADH est réduit via les différentes réactions chimiques du cycle de Krebs, ou cycle de l'acide citrique (**Figure 3**). Le cycle de Krebs permet d'oxyder les groupes acétyles issus de la dégradation des glucides, protéines ou lipides. Ainsi, à partir d'une molécule d'acétate, le cycle de Krebs va réduire 3 molécules de NAD. La 8^e enzyme du cycle, la succinate déshydrogénase (EC 1.3.5.1), a la particularité de faire partie de la chaîne respiratoire et du cycle de Krebs. Le FAD est quant à lui réduit sous forme FADH₂ grâce à la bêta-oxydation des acides gras.

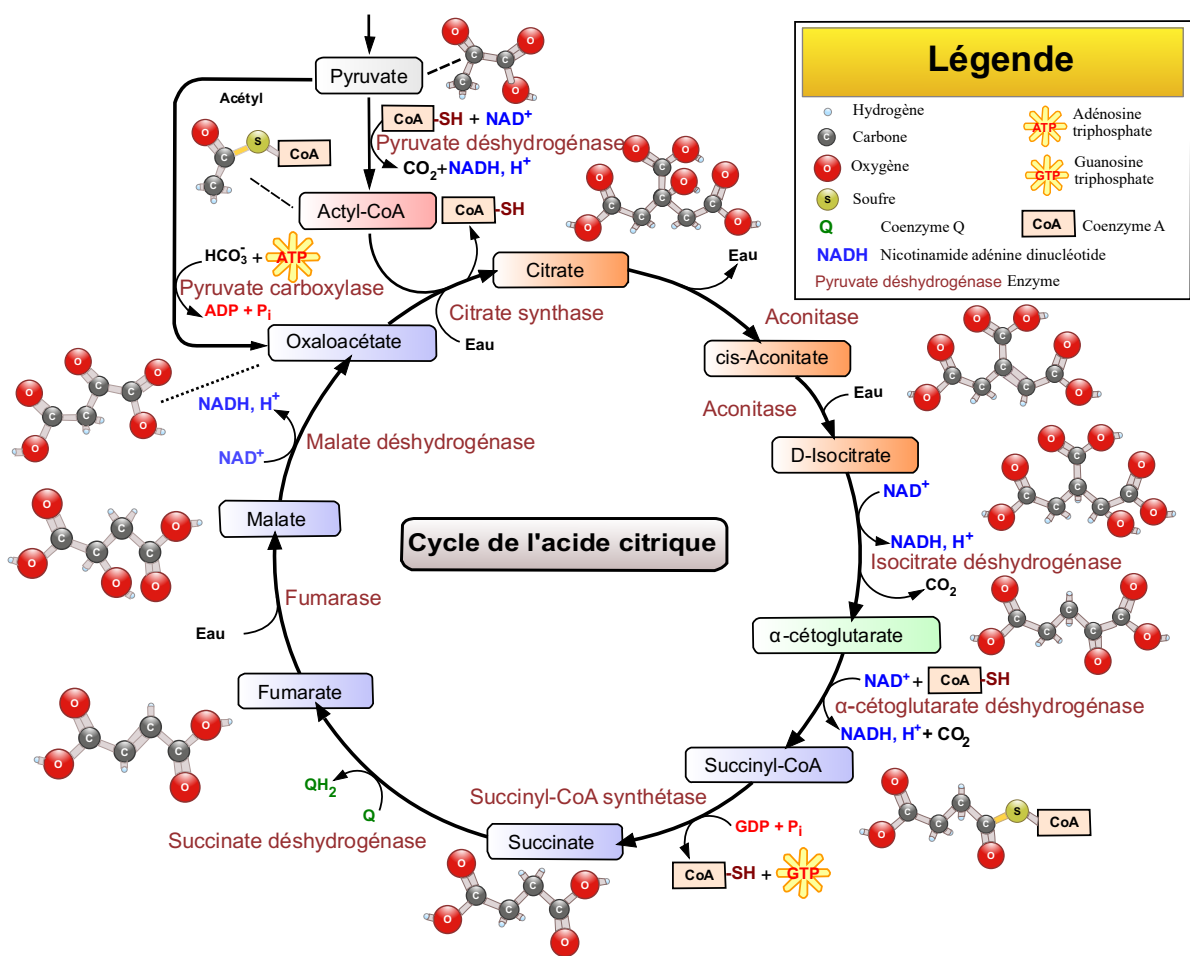


Figure 3. Cycle de Krebs, ou cycle de l'acide citrique.

Le cycle de Krebs comprend l'ensemble des 10 étapes catalysé par 8 enzymes différentes qui permettent de libérer l'énergie via le métabolisme de l'acétyl-CoA.

Le métabolisme de la vitamine B₁₂ interagit indirectement avec le cycle de Krebs. En effet, la voie métabolique intra-mitochondriale de la vitamine B₁₂ permet la synthèse d'adénosylcobalamine, un cofacteur nécessaire à la conversion du L-méthylmalonyl-CoA (issu de la dégradation des acides aminés ramifiés, des acides gras à chaîne latérale à nombre impair d'atomes de carbone) en succinyl-CoA, intermédiaire du cycle de Krebs (**Figure 4**).

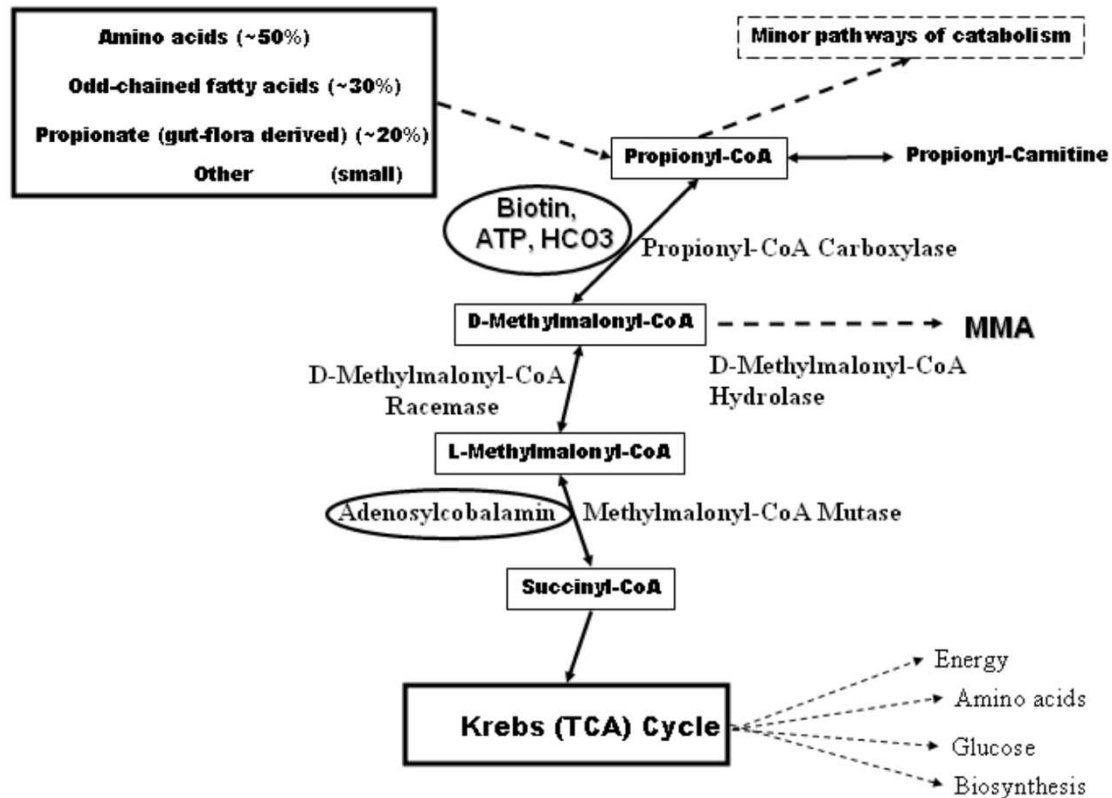


Figure 4. Voie métabolique intra-mitochondriale du propionyl-CoA jusqu'à son entrée dans le cycle de Krebs. (D'après Venditti, Gene review. 2005).

Voie de conversion du propionyl-CoA issu de la dégradation des acides aminés et des acyl-CoA, en succinyl-CoA via 3 étapes et 3 enzymes, permettant la synthèse de succinyl-CoA, intermédiaire du cycle de Krebs.

1.1.4 Folates

1.1.4.1 Structure chimique

L'acide folique (vitamine B₉) est une vitamine hydrosoluble, également appelée acide ptéroylglutamique. Il est composé d'une molécule d'acide glutamique, d'un acide para-aminobenzoïque et d'un noyau ptérine (**Figure 5**). Il est synthétisé par les bactéries, levures ou plantes, et ne l'est pas par les animaux, les rendant de facto dépendants des apports alimentaires. Il est présent principalement dans les légumes à feuilles vertes ou dans les abats et existe majoritairement sous la forme de polyglutamate, c'est-à-dire un enchaînement de plusieurs acides glutamiques.

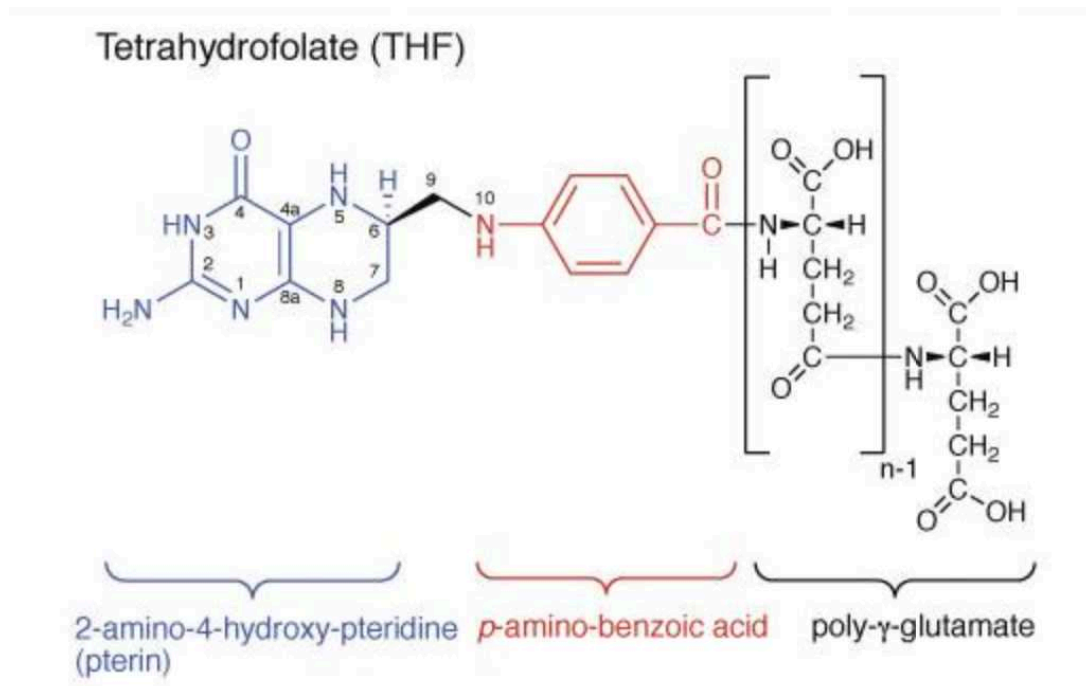
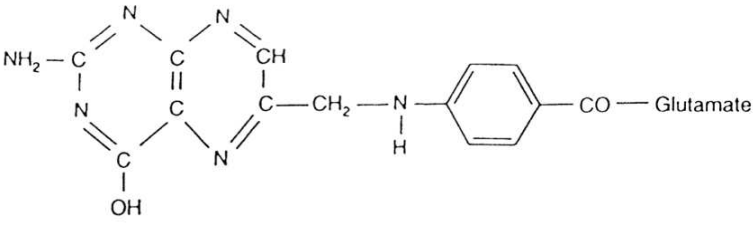
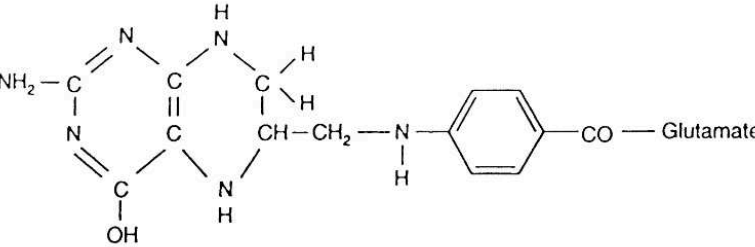
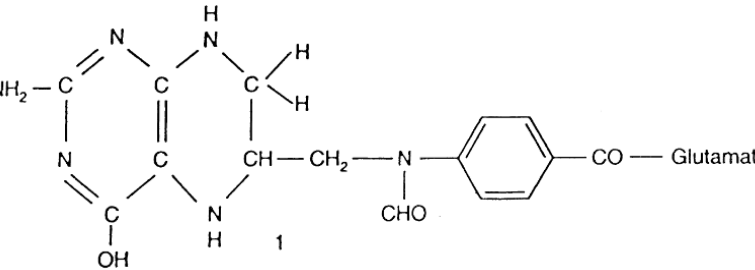
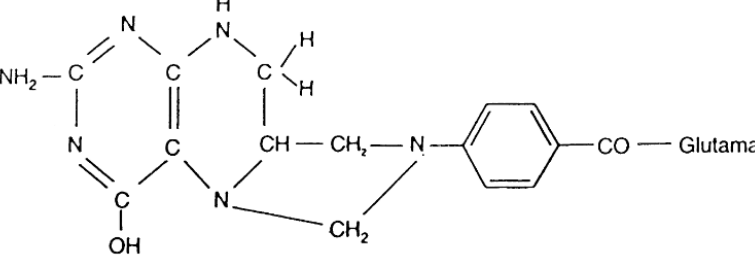
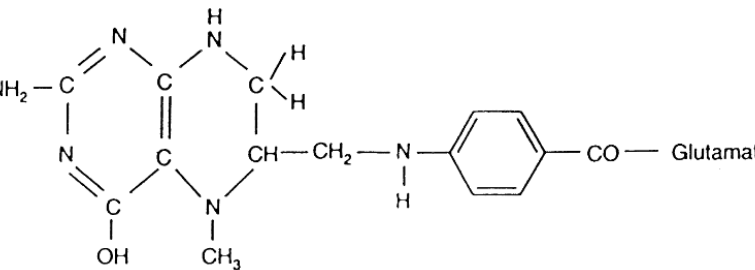


Figure 5. Structure chimique des folates (7). Les folates sont constitués autour d'une structure chimique commune constituée de 3 entités : un noyau ptéridine, un acide para-aminobenzoïque (p-ABA) et un ou plusieurs acides glutamiques. Les différentes formes de folates diffèrent selon l'état d'oxydation du cycle ptéridine, la nature des radicaux sur les azotes en position 5 et en position 10 ainsi que le nombre d'acide glutamique.

L'acide folique, qui correspond à la forme oxydée, n'est pas la forme physiologiquement active de la vitamine B₉. Les formes actives sont des formes réduites : dihydrofolates (DHF) ou tétrahydrofolates (THF) et leurs dérivés méthylés ou formylés (**Table 2**).

Table 2. Structure chimique de l'acide folique, du tétrahydrofolate, du 10-formyltétrahydrofolate, du N5,10-méthylènetétrahydrofolate et du N5-méthyltétrahydrofolate (modifié d'après (8)).

<p>Acide folique</p>	
<p>Tétrahydrofolate THF</p>	
<p>10-Formyltétrahydrofolate 10-FormylTHF</p>	
<p>5,10- Méthylènetetrahydrofolate N5,10-MeTHF</p>	
<p>5-Méthyltetrahydrofolate N5-MeTHF</p>	

1.1.4.2 Histoire

Au début des années 30, Lucy Wills, hématologue britannique rapporte des cas d'anémie sévère au sein d'une population de femmes indiennes, dont une grande proportion était enceinte (9). Cette anémie était caractérisée par la grande taille des globules rouges, appelés mégalo blasts, la différenciant ainsi d'autres anémies tropicales. Les patients s'amélioraient biologiquement après administration d'extraits de foie ou de marmite, une pâte à tartiner industrielle à base d'extraits de levure de bière (10). Quelques années plus tard, la « vitamine M » (pour Monkey) est décrite comme prévenant l'apparition d'une anémie chez les singes ayant une alimentation carencée (11). Au début des années 40, il est observé que l'administration d'un facteur nutritionnel présent dans les extraits de foie permet de corriger les anémies mégalo blastiques (12, 13). En 1941, le nom d'acide folique est donné à partir de sa mise en évidence dans des feuilles d'épinard (14). L'effet des folates comme facteur de croissance est rapidement décrit, permettant d'aboutir à la synthèse d'un antagoniste, l'aminoptérine (suivi par le méthotrexate). Son utilisation en pratique clinique chez un enfant traité pour une leucémie lymphoblastique est le premier effet médicamenteux rapporté sur le métabolisme des folates (15).

Le cycle métabolique des folates, ses interactions avec la méthionine et l'homocystéine, sont décrits durant les 20 années suivantes (16). Les premières recommandations de santé publique nord-américaine de supplémentation en acide folique pendant la grossesse datent de 1992 (17), notamment grâce aux travaux mettant en évidence leur rôle protecteur sur la non fermeture du tube neural pendant l'embryogénèse (18). Cela en fait un des 100 médicaments les plus prescrits aux Etats-Unis sur la période actuelle (19).

1.1.4.3 Nutrition et apport

Les folates ne peuvent être synthétisés par l'organisme humain. Notre statut en folate dépend donc de nos apports alimentaires. Les folates se trouvent principalement dans les légumes à feuilles vert foncé, les haricots, les germes de blé, les betteraves, mais aussi dans les abats (foie), le jaune d'œuf, le lait et les produits laitiers. La cuisson ou la congélation diminuent la teneur en vitamine des aliments. A la fin des années 2010, le statut en folate au sein de la population nord-américaine estime que 10 à 20% de la

population a un apport en folates insuffisant, plus de 20 ans après l'instauration de la supplémentation (Pfeiffer et al. 2019).

Les dernières recommandations françaises datent de 2021 (20) (**Table 3**). Elles définissent les apports journaliers recommandés selon l'âge et le sexe de l'individu. Si les besoins en vitamine B₉ ne sont pas couverts, une carence peut apparaître et entraîner l'apparition de problèmes de santé, notamment chez les populations à risque (femme enceinte, personne alcoolique chronique). A l'inverse, un apport important en vitamine B₉ peut entraîner l'apparition de troubles neurologiques notamment chez le patient carencé en vitamine B₁₂.

Table 3. Références nutritionnelles pour la vitamine B₉ en µg (Équivalent Folate Alimentaire /j) d'après les recommandations françaises actualisées (mars 2021).

Groupe de population	BNM	RNP	AS	LSS
Nourrisson de moins de 6 mois	-	-	65	-
Nourrisson de 6 mois et plus	-	-	80	-
Enfant de 1 à 3 ans	90	120	-	200
Enfant de 4 à 6 ans	110	140	-	300
Enfant de 7 à 10 ans	160	200	-	400
Adolescent de 11 à 14 ans	210	270	-	600
Adolescent de 15 à 17 ans	250	330	-	800
Homme et femme de 18 ans et plus	250	330	-	1000
Femme susceptible de devenir enceinte et femme enceinte	-	-	600*	1000
Femme allaitante	380	500	-	1000

Note : BNM : besoin nutritionnel moyen ; RNP : référence nutritionnelle pour la population ; AS : apport satisfaisant ; LSS : limite supérieure de sécurité.

* : Valeur possiblement surestimée pour le 2^e et 3^e trimestre de grossesse mais en deçà de la LSS

1.1.4.4 Rôles des folates

Les folates jouent plusieurs rôles essentiels dans le bon fonctionnement de l'organisme, notamment sous la forme des dérivés THF, co-enzymes dans différentes réactions de transfert de groupement méthyle (7). Parmi ces différentes réactions, nous pouvons rapporter :

- A. La synthèse de déoxythymidine monophosphate (dTMP). Il s'agit d'une base pyrimidique produite à partir de deoxyuridine monophosphate (dUMP), dont la réaction est catalysée par la thymidylate synthase (TYMS) avec comme enzyme le 5,10-Me-THF-dépendant (21). Cette réaction est nécessaire à la synthèse d'ADN, et la cible de traitements antitumoraux comme le 5-fluorouracil.
- B. Le 5,10-Me-THF est le cofacteur de la serine hydroxyméthyltransferase (SHMT) qui permet la conversion de glycine et serine, ou inversement (22).
- C. Le 5-Me-THF, synthétisé à partir du 5,10-Me-THF grâce à la méthylène tétrahydrofolate réductase (MTHFR), va permettre la reméthylation de l'homocystéine en méthionine. Cette étape est indispensable au cycle de la méthionine (5).
- D. Le 10-formyl-THF est nécessaire à la synthèse de novo des bases puriques (adénine ou guanine) constituant les brins d'ADN et d'ARN, via un complexe enzymatique, le purinosome (23). Il est également utilisé pour la formylation des protéines (24).

1.1.5 Vitamine B₁₂

1.1.5.1 Structure chimique

La vitamine B₁₂, ou cobalamine, est une vitamine hydrosoluble, requise comme co-enzyme pour différentes réactions de l'organisme. Sur le plan moléculaire, il s'agit d'une macromolécule organométallique constituée d'un cycle corrine (composé de quatre molécules de pyrrole liant en leur centre un atome de cobalt) et d'un ligand inférieur de type diméthylbenzimidazole (DMB), molécule complexe constituée par l'association d'un sucre, d'un phosphate et d'une pseudo-base azotée (**Figure 6**).

L'atome de cobalt a un état d'oxydation, allant de +I (cob(I)alamine) à +III (cob(III)alamine), et peut fixer de quatre à six ligands (25). A l'état d'oxydation +III, cinq des six ligands de l'atome central de cobalt sont endogènes (cycle corrine et DMB). Un groupement variable R se trouve en position axiale supérieure (position β). Selon le groupement fixé en position β , les propriétés de la vitamine, et donc ses fonctions, sont différentes. Ce composé détermine également le nom de la vitamine : -CN pour cyanocobalamine (forme circulante), -OH pour hydroxocobalamine (forme circulante), -CH₃ pour méthylcobalamine (cofacteur de la MS) et adénosyl- pour 5'-désoxyadénosylcobalamine (cofacteur de la MCM).

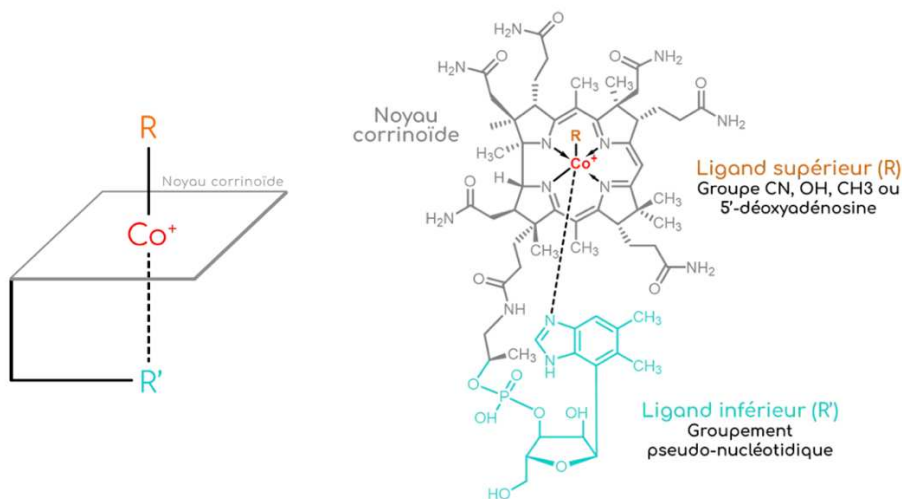


Figure 6. Structure chimique de la vitamine B₁₂

La vitamine B₁₂ est composée d'un atome de cobalt au centre d'un cycle corrine (4 molécules de pyrrole). L'atome de cobalt crée une liaison avec le DMB en position inférieure, jouant le rôle de ligand inférieur. Il existe des pseudocobalamines produites par des cyanobactéries avec un autre ligand inférieur, l'adénine. Le ligand supérieur confère des propriétés différentes à la vitamine B₁₂ selon qu'il s'agisse d'un composé cyano, méthyle, adénosyle ou hydroxo.

La forme cob(II)alamine n'a généralement pas de ligand en position axiale β , correspondant habituellement à une étape de décyanation. L'atome de cobalt a alors 5 liaisons covalentes. C'est un intermédiaire indispensable à la synthèse des formes actives de la vitamine B₁₂. Enfin, la forme cob(I)alamine n'a pas de groupement en position axiale. Il s'agit d'une molécule très réactive avec un fort potentiel réducteur, pouvant entraîner la formation de radicaux libres et exposant donc son environnement immédiat au risque de lésions moléculaires.

1.1.5.2 Histoire

Durant la 2^e partie du XIX^e siècle, Thomas Addison a décrit un type d'anémie chez l'Homme, caractérisée par Anton Biermer en 1872 comme « anémie pernicieuse » car elle était « durable, fatale et de cause inconnue ». En 1877, Georges Hayem détecte des cellules sanguines de grande taille, pauvres en hémoglobine. Observation confirmée en 1880 par Paul Ehrlich décrivant alors les mégalo blasts. Dans les années 1880, William Osler et William Gardner ont rapporté un cas de neuropathie associé à cette anémie. Les fondements séméiologiques de la carence d'apport en vitamine B₁₂ étaient décrits. Il faut attendre les années 1920 pour voir George Whipple, George Minot et William Murphy démontrer que des extraits de foie peuvent corriger l'anémie pernicieuse (26). Ils obtiendront le prix Nobel en 1934.

William Castle démontra l'existence d'un « facteur intrinsèque » présent dans les sécrétions gastriques permettant l'absorption de la vitamine B₁₂. En 1948, Mary Shorb en collaboration avec Karl Folkers, ont extrait le « facteur extrinsèque » à partir d'extraits de foie, en se basant sur des travaux issus de l'industrie agroalimentaire et de la fabrication du yaourt. Ce « facteur extrinsèque » nouvellement isolé devient la vitamine B₁₂, dont la structure sera décrite en 1954 par Todd (27). Elle sera décrite en cristallographie par Dorothy Hodgkin (28). Ils obtiendront le prix Nobel de chimie respectivement en 1957 et en 1964 pour leurs travaux.

Les 10 années suivantes sont marquées par la mise au point du processus industriel permettant la synthèse totale de la vitamine B₁₂, par fermentation bactérienne, publié par R.B. Woodward en partenariat avec A. Eschenmoser (29). Restait à comprendre la synthèse du DMB, indispensable au bon fonctionnement de la vitamine B₁₂ (30). Cette étape a été observée en 2007, plus de 150 ans après les premières descriptions cliniques de carence, par l'équipe de Graham Walker du MIT.

Ils ont découvert chez le *Sinorhizobium meliloti*, une bactérie vivant en symbiose avec une plante, le rôle du gène *bluB*, qui utilise la vitamine B₂ pour permettre la synthèse du DMB. Le processus de synthèse de la vitamine B₁₂ était alors complètement décrit.

1.1.5.3 Apports journaliers recommandés

Tout comme pour les folates, l'être humain est dépendant des apports alimentaires en vitamine B₁₂. La cobalamine est principalement présente dans les aliments d'origine animale comme le foie (de bœuf, mouton, veau), les rognons, la viande cuite, les volailles, le jaune d'œuf, les poissons et les crustacés (palourde, pieuvre, moule). Un régime européen sans éviction particulière apporte 5 à 30 µg de vitamine B₁₂ quotidiennement, soit nettement plus que les apports recommandés (31). Les carences d'apport sont donc rares chez l'adulte européen en bonne santé avec une alimentation diversifiée, mais plus fréquentes chez les sujets ayant une alimentation végétalienne stricte sans supplémentation (32).

Les dernières recommandations françaises de 2021 (20) (**Table 4**) décrivent les apports journaliers recommandés selon l'âge et le sexe de l'individu. Il n'existe pas de dose toxique pour la vitamine B₁₂. Vitamine hydrosoluble, l'organisme élimine par voie urinaire l'excédent d'apport inutilisé. La carence d'apport est en revanche considérée comme un problème de santé publique par l'OMS. Elle est estimée à 10-30% de la population âgée occidentale et 50%, voire 75%, de la population dans les pays en voie de développement (33, 34).

De nombreuses pathologies digestives et diverses situations responsables de malabsorption peuvent être à l'origine d'une carence en vitamine B₁₂, comme les gastrectomies (totales ou partielles), l'insuffisance pancréatique exocrine, la maladie de Crohn, les lymphomes et l'anémie de Biermer.

Table 4. Apports journaliers recommandés pour la vitamine B₁₂ en µg/j d'après les recommandations françaises actualisées (mars 2021).

Groupe de population	AS
Nourrisson de moins de 6 mois	0,4
Nourrisson de 6 mois et plus	1,5
Enfant de 1 à 3 ans	1,5
Enfant de 4 à 6 ans	1,5
Enfant de 7 à 10 ans	1,5
Adolescent de 11 à 17 ans	2,5
Homme et femme de 18 ans et plus	4
Femme enceinte	4,5
Femme allaitante	5

Note : AS : apport satisfaisant.

1.1.5.4 Rôles de la vitamine B₁₂

Le métabolisme de la vitamine B₁₂ permet la synthèse de 2 formes actives à partir de la forme ingérée :

- A. La première est la méthylcobalamine (MeCbl). Cette forme de la cobalamine est utilisée par la méthionine synthase, ou 5-méthyltétrahydrofolate-homocystéine méthyltransférase, (MS, EC 2.1.1.13), codée par le gène *MTR*. Elle apporte des groupements méthyles pour les différentes réactions de méthylation de l'organisme (35).
- B. La deuxième est l'adénosylcobalamine (AdoCbl) (36). Il s'agit du cofacteur de la méthylmalonyl-CoA mutase (MCM, E.C. 5.4.99.2), codé par le gène *MMUT* (37) dernière étape dans la dégradation du propionyl-CoA en succinyl-CoA, intermédiaire indispensable du cycle de Krebs.

1.2 Métabolisme des monocarbones

1.2.1 Métabolisme des folates

1.2.1.1 Absorption

Les folates sont ingérés sous la forme de polyglutamates présents dans les aliments. Ils sont digérés dans la lumière intestinale grâce à une enzyme de la bordure en brosse des entérocytes, la folylpolyglutamate carboxypeptidase (FGCP) ou γ -glutamyl hydrolase (GH), qui permet leur déconjugaison en monoglutamate (38). Ils sont ensuite absorbés au niveau du jéjunum et du duodénum, notamment via 2 transporteurs spécifiques (**Figure 7**) (39-41) :

- Le PCFT1 (Proton-Coupled Folate Transporter, codé par le gène *SLC46A1*), dont le fonctionnement est optimal à pH acide, avec une affinité plus importante pour l'acide folique.
- Le SLC19A1 ou RFC (Reduced Folate Carrier, codé par le gène *RFC*). Il s'agit d'un transporteur de 591 acides aminés et 12 domaines transmembranaires, ayant une grande affinité pour les formes réduites (5-méthylTHF et 5-formylTHF) et pour les antifolates tel que le méthotrexate.

Les monoglutamates sont réduits et méthylés en THF et 5-MeTHF dans les entérocytes avant de passer dans la circulation sanguine portale (40).

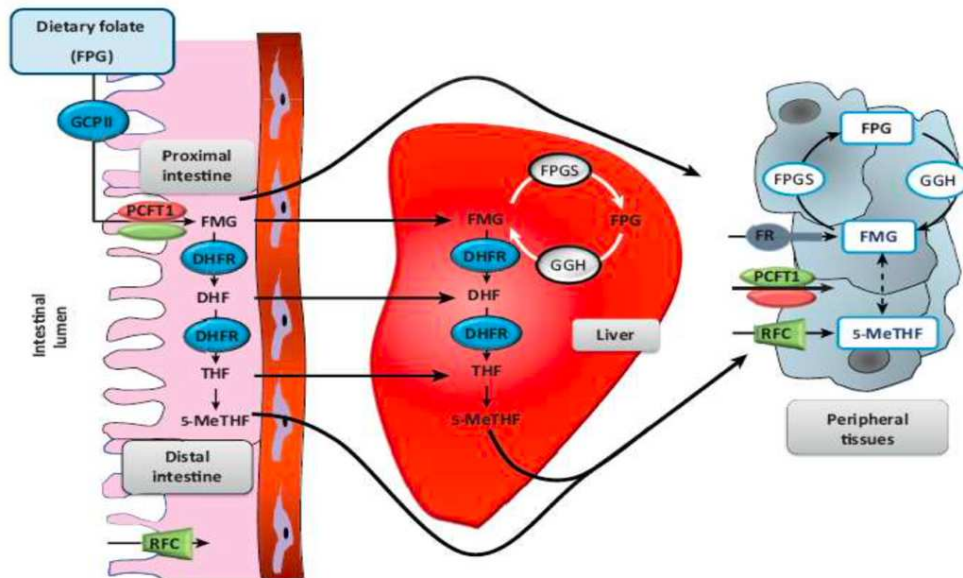


Figure 7. Absorption et transport des folates vers le foie et les tissus périphériques (d'après Guéant and al. 2013).

1.2.1.2 Transport

Les monoglutamates circulent dans le sang principalement sous forme 5-MeTHF, qui sont soit liés à l'albumine (ligand de faible affinité), soit au « Folate Binding Proteins Solubles » (S-FBP) (ligand de forte affinité). Ils sont acheminés aux tissus périphériques, par lesquels ils sont captés grâce à 3 types de récepteur (40) :

- Les récepteurs des folates (FR). La famille des FR comprend le FRa, FRb et FRg, codés par trois gènes distincts. FRa et FRb sont liés aux membranes cellulaires par une ancre glycosylphosphatidylinositol (GPI), alors que FRg est un récepteur soluble. Cette ancre permet l'internalisation des folates par endocytose. L'expression de FRa est plus importante chez l'adulte, et prédominante dans l'entrée des folates au niveau cérébral.
- Le RFC, dont l'expression est ubiquitaire, avec un échange anionique bidirectionnel.
- PCTF1 exprimé dans de nombreux tissus, notamment le foie et les glandes surrénales. Il joue également un rôle important dans la réabsorption des folates au niveau rénal.

1.2.1.3 Stockage et élimination

Le foie va stocker la moitié des réserves en folate de l'organisme (10 à 15 mg), principalement sous forme 5-MeTHF. Les hépatocytes assimilent 10 à 20% des folates circulants, le reste étant distribué aux autres tissus. Les globules rouges sont également une réserve importante de folates. Les réserves de l'organisme sont suffisantes pour couvrir les besoins en folate en l'absence d'apports pendant environ 4 mois. Les cellules séquestrent ces monoglutamates par polyglutamylation via la folylpoly- γ -glutamate synthétase (FPGS) par l'ajout de 4 à 8 résidus glutamates (40). Cette réaction est réversible. Les résidus glutamates en position terminale peuvent être hydrolysés par la γ -glutamyl hydrolase (GH). Les folates sont éliminés par voie biliaire et voie urinaire, la quantité éliminée correspondant à seulement 0,3 à 0,8% du pool de folates de l'organisme (42).

1.2.2 Métabolisme de la vitamine B₁₂

1.2.2.1 Absorption

L'absorption de la cobalamine est un processus physiologique complexe nécessitant l'intégrité de nombreuses molécules (**Figure 8**) (43, 44).

La première étape se fait dès la mastication. Les cobalamines sont ingérées, principalement liées à des protéines d'origine animale. Les molécules de cobalamines libres sont fixées par des haptocorrines salivaires. Le milieu acide de l'estomac dû aux sécrétions d'acide chlorhydrique permet la lyse protéique. Les cobalamines sont alors fixées par l'haptocorrine et ainsi protégées de la dégradation, permettant de continuer leur progression vers le duodénum (45). Dans ce milieu alcalin, les haptocorrines sont dégradées par les sucs pancréatiques (46), la cobalamine libre est alors liée au facteur intrinsèque (FI), sécrété par les cellules pariétales de l'estomac (47, 48). Au niveau de l'iléon terminal, le complexe Cbl-FI se fixe à un récepteur spécifique de la bordure en brosse des cellules épithéliales : le complexe Cubam. Il s'agit d'un hétérodimère formé par l'association de la cubiline (codée par le gène *CUBN*) et de la protéine amnionless (codée par le gène *AMN*) (49-51). Le complexe est internalisé dans la cellule par endocytose et le FI est dégradé du fait de l'acidification de l'endosome. La vitamine B₁₂ est exportée de la cellule via une protéine basolatérale « multidrug resistance protein 1 » (MRP1) (52) et d'autres voies non spécifiques (53).

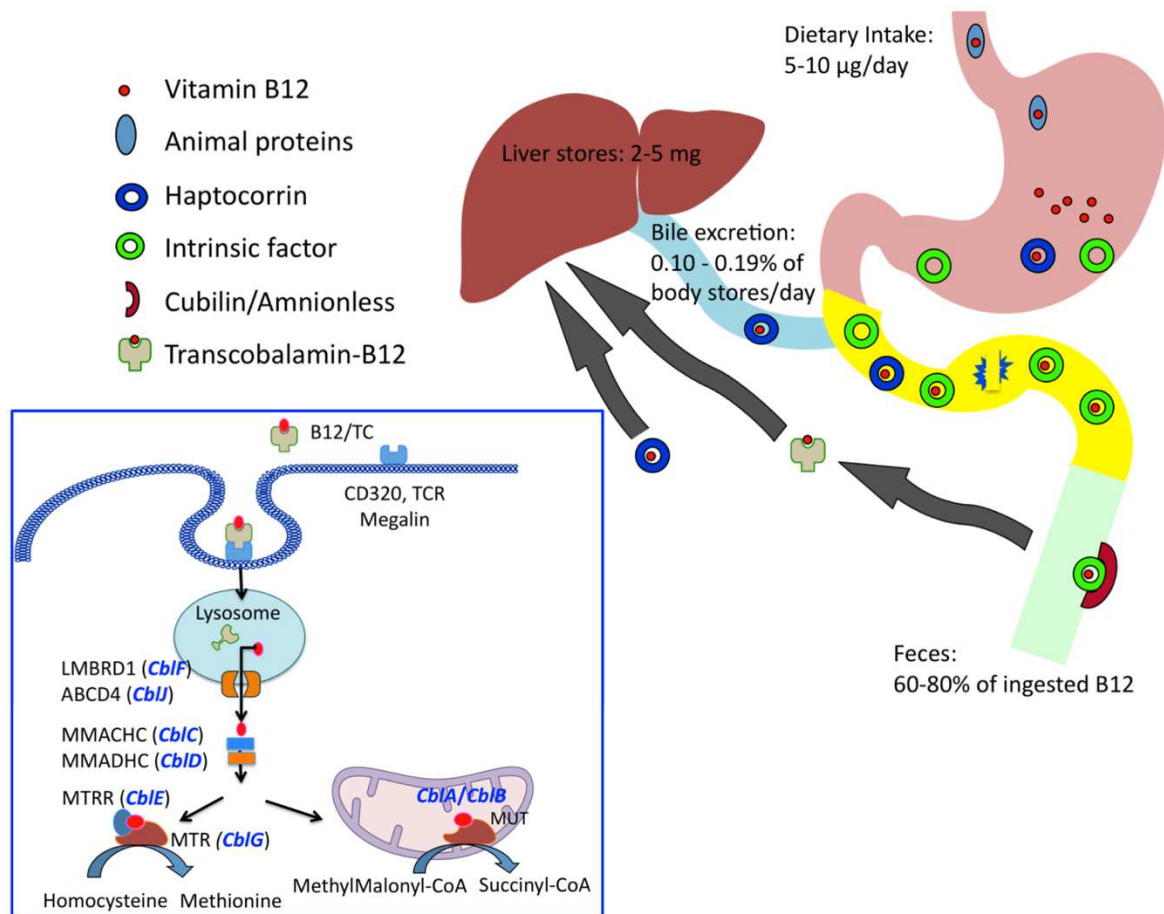


Figure 8. Le transport intraluminal, l'absorption et la circulation entéro-hépatique de la vitamine B₁₂ (Guéant and al. 2022)

1.2.2.2 Transport

Dans le sang, la plus grande proportion de cobalamine est liée à l'haptocorrine plasmatique (ou transcobalamine I, TCI), alors que son affinité est plus importante pour la transcobalamine II (TCII) (53, 54). Selon la protéine à laquelle elle est liée, l'adressage de la vitamine B₁₂ est différent. La vitamine B₁₂ fixée à l'haptocorrine est principalement adressée aux hépatocytes, via un récepteur non exprimé sur les autres cellules, notamment pour y être stockée. Le complexe Cbl/TCII se fixe sur des récepteurs spécifiques, ubiquitaires, mais différents selon les tissus.

Au niveau rénal il est reconnu par le récepteur mégalin, exprimé par le pôle apical de l'épithélium tubulaire du tubule proximal, jouant un rôle important dans le stockage et l'élimination de la vitamine B₁₂ (55). Dans les autres tissus de l'organisme,

le complexe Cbl-TCII se fixe sur le récepteur CD320 (56, 57). Le complexe pénètre dans la cellule par endocytose, le lysosome est alors la première étape du métabolisme intracellulaire.

1.2.2.3 Métabolisme intracellulaire

Le métabolisme intracellulaire de la vitamine B₁₂ correspond à la succession des différentes étapes qui aboutissent à la synthèse des 2 formes bioactives de la vitamine B₁₂ : la méthylcobalamine et l'adénosylcobalamine. Cette voie métabolique est d'abord commune, avant de se séparer en une voie cytosolique jusqu'à la synthèse de MeCbl, et une voie mitochondriale aboutissant à la synthèse d'AdoCbl (**Figure 9**).

Une fois entrée dans la cellule, la première étape de ce métabolisme est la séparation du complexe Cbl-TCII. A l'intérieur de la vésicule d'endocytose, l'acidification progressive permet la dégradation de TCII. La cobalamine sort du lysosome grâce à deux transporteurs : LMBD1 (lipocalin-1-interacting membrane receptor domain-containing-1) (58) et ABCD4 (adenosine triphosphate-binding cassette subfamily D member) (59). Dans le cytosol, la cobalamine se lie à la protéine MMACHC (methylmalonic aciduria cblC type with homocystinuria) (60). Cette protéine permet de catalyser la réaction de désalkylation (61) des alkylcobalamines (AdoCbl et MeCbl) mais également la réaction de décyanation (62) de la cyanocobalamine (CNCbl). Elle permet donc de soustraire le groupement situé en position supérieure du noyau corrine. La vitamine B₁₂, sous sa forme réduite cob(II)alamin, associée à MMACHC, interagit avec la protéine MMADHC (methylmalonic aciduria cblD type with homocystinuria) (63), permettant son adressage à la mitochondrie via la séquence N-terminale, la partie C-terminale étant elle associée à la voie intra-cytosolique (64-66).

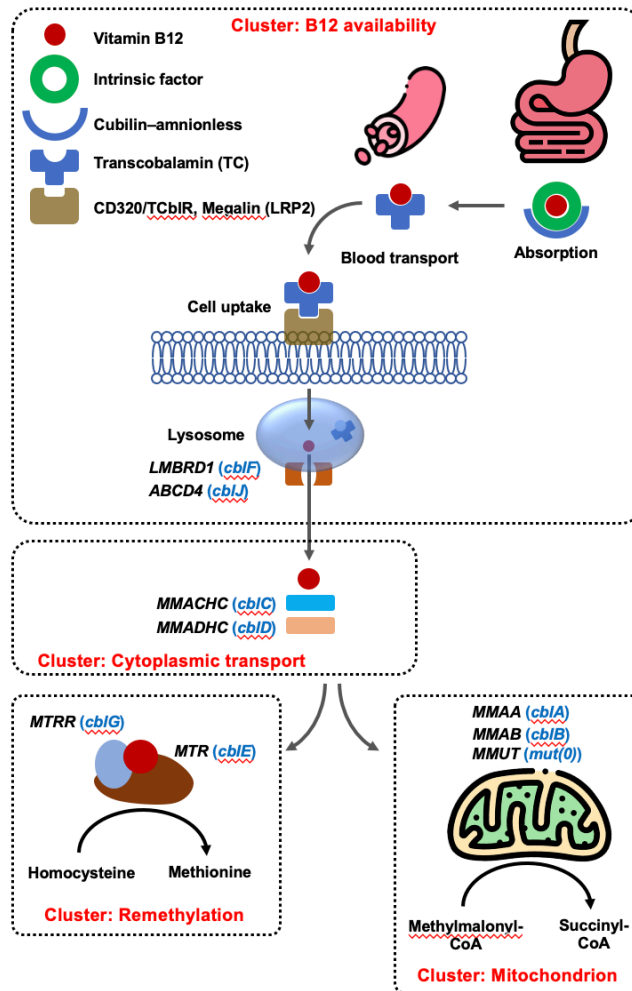


Figure 9. Métabolisme intracellulaire de la vitamine B₁₂ et groupes fonctionnels de gènes. Les quatre groupes sont définis en fonction des conséquences métaboliques des gènes impliqués dans les troubles héréditaires du métabolisme de la vitamine B₁₂. Le groupe « Biodisponibilité de la B₁₂ » comprend les défauts des gènes impliqués dans l'absorption, le transport sanguin et l'absorption cellulaire de la B₁₂, avec un niveau anormal attendu de vitamine B₁₂ sanguine et/ou de protéines de transport ainsi qu'une augmentation combinée de l'homocystéine et de l'acide méthylmalonique. Il convient de noter que les anomalies génétiques dans l'exportation des lysosomes peuvent également entraîner un déficit en vitamine B₁₂ par le biais d'une altération de l'absorption de la vitamine B₁₂. Le groupe « Transport cytoplasmique » comprend les anomalies génétiques du transport cytoplasmique avec un taux sanguin normal de vitamine B₁₂ et/ou de protéines de transport ainsi qu'une augmentation combinée de l'homocystéine et de l'acide méthylmalonique. Le groupe « Reméthylation » comprend des défauts génétiques de la voie de reméthylation de l'homocystéine avec un taux sanguin normal attendu de vitamine B₁₂ et/ou de protéines de transport et d'acide méthylmalonique et un taux accru d'homocystéine. Le groupe « Mitochondrie » comprend des défauts de gènes impliqués dans le traitement de la B₁₂ par la mitochondrie et la conversion du L-méthylmalonyl-CoA en succinyl-CoA. Les groupes de complémentation correspondant aux défauts du métabolisme de la vitamine B₁₂ sont indiqués en caractères bleus. Figure publiée dans l'article 1.

Les mécanismes d'entrée du complexe cobalamine-protéine au travers de la membrane mitochondriale ne sont aujourd'hui pas élucidés. Des travaux récents sur une population de *Caenorhabditis elegans* a permis de décrire le rôle potentiel de transporteur de type ATP-binding cassette type G (ABCG) dans ce process (67). Dans la mitochondrie, la cobalamine interagit avec la protéine MMAB (methylmalonic aciduria cblB type), permettant la synthèse d'AdoCbl, réaction ATP-dépendante (68). L'AdoCbl est le cofacteur de la MUT. Le transfert de l'AdoCbl entre MMAB et MUT se fait directement par association des deux protéines (69). Ce transfert nécessite une 3^e protéine, la methylmalonic aciduria cblA type (MMAA). Cette dernière a un rôle critique puisqu'elle protège l'AdoCbl d'une réaction d'oxydation (70). La protéine MUT peut alors catalyser la transformation de L-méthylmalonyl-CoA en Succinyl-CoA, étape importante du catabolisme du propionate et nécessaire au bon fonctionnement du cycle de Krebs

La voie cytoplasmique permet la formation de MeCbl, cofacteur de la MS grâce aux interactions entre le complexe Cbl-MMACHC-MMADHC avec MS (71). La Cbl sous sa forme cob(I)alamin, associée à MS, va fixer un groupement méthyle provenant d'une molécule de 5Me-THF, puis le transférer sur une homocystéine, produisant une méthionine et un tétrahydrofolate (THF). La MS utilisée, sera réactivée grâce à la méthionine synthase reductase (MSR) (72). La méthionine, via le cycle de la méthionine, sert de base à de nombreuses réactions de méthylation.

1.2.2.4 Stockage et élimination

Les réserves en vitamine B₁₂ sont principalement hépatiques pour 50% (73), mais aussi cardiaques et spléniques. Elles sont estimées entre 2 et 4 mg, Hors situation de grossesse ou d'allaitement, les besoins quotidiens d'un adulte sont estimés à 4 µg/j, L'organisme dispose donc de réserves pour plusieurs années. La cobalamine non utilisée est excrétée par voie biliaire ou par voie urinaire (74, 75).

1.2.3 Le cycle de la méthionine

La méthionine est un acide aminé protéinogénique (**Figure 10A**), c'est-à-dire qu'elle est incorporée dans les protéines lors de la traduction de l'ARNm par les ribosomes. Elle est caractérisée par une fonction thioéther. Elle est synthétisée dans l'organisme à partir d'une homocystéine (Hcy), via une réaction impliquant la MS et la MeCbl. L'homocystéine est un acide aminé non protéinogénique soufré (**Figure 10B**). L'Hcy peut être synthétisée par toutes les cellules de l'organisme, puis méthylée en méthionine ou convertie en cystéine. Chez un adulte, l'homocystéine plasmatique normale est comprise entre 5 et 15 $\mu\text{mol/L}$. Une augmentation de cette concentration au-dessus des valeurs normales définit une hyperhomocystéinémie (HHcy). Selon le niveau plasmatique, on distingue trois catégories d'HHcy: modérée (16 à 30 $\mu\text{mol/L}$), intermédiaire (31 - 100 $\mu\text{mol/L}$) et sévère ($> 100 \mu\text{mol/L}$) (76).

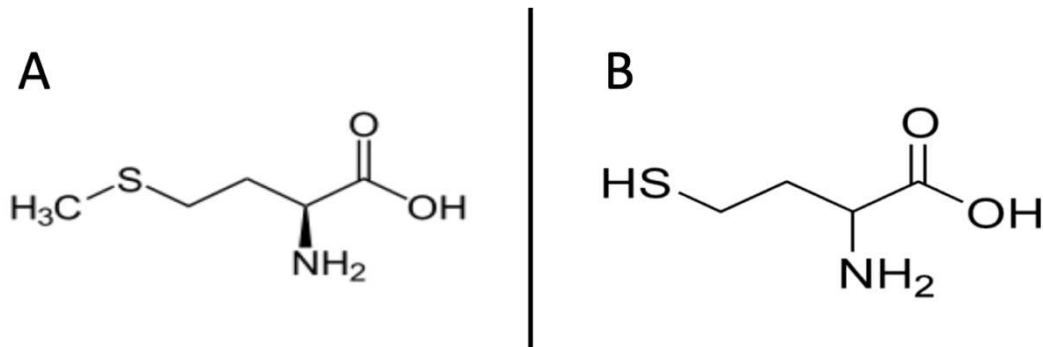


Figure 10. Représentation graphique de la méthionine (A) et de l'homocystéine (B).

1.2.3.1 Cycle SAM/SAH

Dans le cytosol, via le cycle de la méthionine (**Figure 11**), la cellule synthétise du SAM, à partir d'ATP et de méthionine, grâce à la Méthionine Adénosyltransférase (MAT). Il existe deux formes de MAT : une dont l'expression est spécifique au foie (MAT1A) et une forme d'expression ubiquitaire (MAT2A) dont l'activité est régulée par une sous-unité associée (MAT2B). Le SAM est le principal donneur de méthyle de l'organisme, servant de substrat pour les nombreuses méthyltransférases (représentant environ 1% des gènes codés) (77) et permettant les réactions de méthylation des métabolites, de l'ADN, de l'ARN mais aussi des histones (78-80).

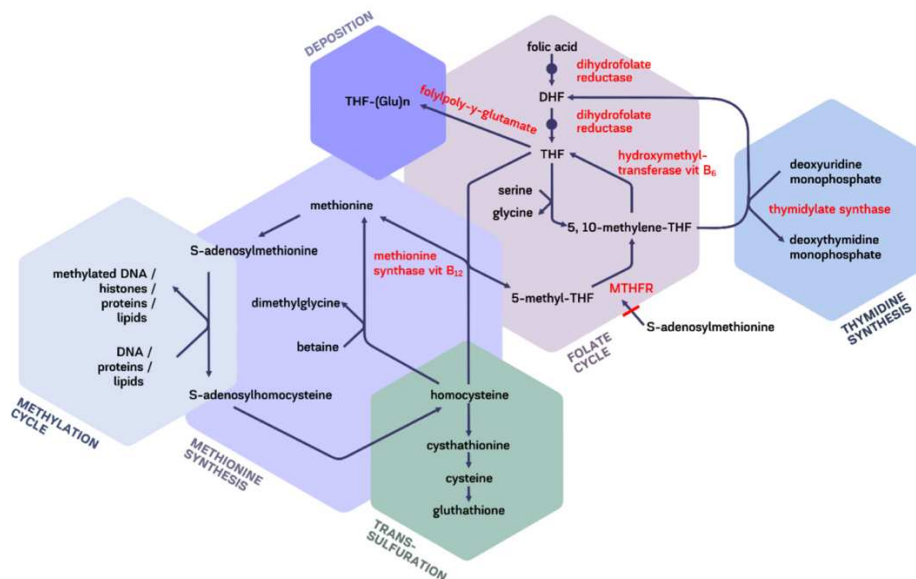


Figure 11. Interactions entre le cycle des folates et le cycle de la méthionine (d'après Y. Shulpekova and al. 2021). La vitamine B₁₂ est le cofacteur de la MS. Elles sont à l'interface entre le cycle des folates, qui apportent un groupement méthyle et le cycle de la méthionine. Via la réaction catalysée par MS, une homocystéine est transformée en une méthionine, précurseur de la S-adénosyl méthionine (SAM), utilisée pour diverses réactions de méthylation.

Notes : DHF : Dihydro-folate ; MTHFR : 5,10-Méthylènetétrahydrofolate réductase ; THF : tétrahydro-folate. Les noms des enzymes à l'interface des cycles sont notés en rouge.

Une fois le groupement transféré, le SAM devient un SAH, qui va lui-même être dégradé par l'organisme en homocystéine et en adénosine grâce à l'adénosylhomocystéine-hydrolase (AHCY) (81). Le cycle est alors bouclé, avec la reformation d'une homocystéine qui pourra à nouveau être méthyliée en méthionine, et ainsi de suite. Le ratio SAM/SAH est un marqueur de la capacité de méthylation de la cellule. En effet, une accumulation de SAM est responsable d'une inhibition d'activité de MTHFR, et donc une diminution de reméthylation de l'homocystéine en méthionine. Elle est aussi responsable d'une augmentation de l'activité de la cystathionine beta-synthase (CBS), permettant la dégradation de l'homocystéine (82).

1.2.3.2 Métabolisme de l'homocystéine - Transsulfuration

L'accumulation d'homocystéine a un effet toxique pour l'organisme. Cet acide aminé peut être catabolisé de manière irréversible via la voie de la transsulfuration. Une homocystéine est associée à une sérine pour former une cystathionine grâce à la cystathionine β -synthase (CBS) (83). Puis la cystathionine est réduite en cystéine et en α -cétobutyrate via une réaction catalysée par la γ -cystathionase. Ces deux enzymes utilisent la forme active de la vitamine B₆, le pyridoxal 5'-phosphate comme cofacteur. La cystéine est utilisée entre autres pour synthétiser du glutathion (GSH), jouant un rôle important pour la cellule dans sa capacité de réponse au stress oxydatif (84). Cette voie est donc primordiale dans les cellules ayant une forte consommation en glutathion tel que les hépatocytes et les neurones (85).

1.3 Erreurs innées du métabolisme de la vitamine B₁₂

Les erreurs innées du métabolisme de la vitamine B₁₂ sont un défaut de fonctionnement d'une enzyme, celle-ci permettant la synthèse d'une ou des deux isoformes actives de la vitamine B₁₂, la MeCbl ou l'AdoCbl. La carence d'apport est, quant à elle, responsable d'un défaut de synthèse par défaut de substrat.

1.3.1 La carence en vitamine B₁₂

Nous avons déjà évoqué que la carence en vitamine B₁₂ est considérée comme un problème majeur de santé publique par l'OMS. En effet, si les carences sont plutôt rares chez un adulte en bonne santé dans les pays occidentaux, du fait d'une alimentation variée, elle est retrouvée en cas de régimes végétaliens non supplémentés ou dans des régions du monde où l'alimentation d'origine animale est insuffisante.

1.3.2 Troubles de l'absorption

Toute situation responsable d'une amputation partielle ou totale du tube digestif peut être responsable d'une malabsorption de la vitamine B₁₂. C'est notamment le cas des gastrectomies partielles ou totales. D'autres pathologies, responsables d'un tableau clinique de malabsorption (maladie de Crohn, colite ulcéreuse, maladie coéliqua), sont associées à une carence en vitamine B₁₂ (86, 87). Dans l'anémie de Biermer, une maladie auto-immune, il est observé une production d'auto-anticorps dirigés contre les cellules pariétales gastriques (62% des patients) et/ou contre le facteur intrinsèque (FI) (87,5% des patients). La pathologie est responsable d'une insuffisance de disponibilité du FI, la vitamine B₁₂ n'est plus absorbée (88).

1.3.3 Conséquence physiopathologique d'une carence en vitamine B₁₂

La carence en vitamine B₁₂ est responsable d'une augmentation des taux d'acide méthylmalonique (MMA) et d'homocystéine (Hcy) dans le sang et l'urine par diminution de l'activité de la MS et MUT (89).

Une carence en vitamine B₁₂ est responsable d'une diminution de synthèse de méthionine et donc de SAM. Ceci a un impact sur le cycle des folates, puisque le SAM est un effecteur allostérique de MTHFR. La diminution en SAM entraîne une diminution de l'inactivation – donc une activation – de MTHFR (90); le N⁵,10-MeTHF, métabolite actif, est donc trop converti en N⁵-MeTHF, un métabolite inactif (**Figure 12**). De plus,

1.3.4 Généralités sur les erreurs innées du métabolisme

Les maladies héréditaires du métabolisme (MHM) sont un groupe de maladies rares qui résultent le plus souvent d'un déficit de fonctionnement d'une enzyme sur l'une des nombreuses voies métaboliques du corps (98). Ce déficit enzymatique est responsable du déficit de synthèse d'un produit et/ou de l'accumulation d'un composé en amont, pouvant avoir un effet toxique direct, ou indirect via un métabolite secondaire (**Figure 13**). Un désordre du métabolisme peut toucher tous les organes, et peut survenir à tout âge de la vie. En effet, si une révélation néonatale est caricaturale, une révélation durant l'enfance ou l'âge adulte est fréquente et souvent associée à un déficit enzymatique partiel.

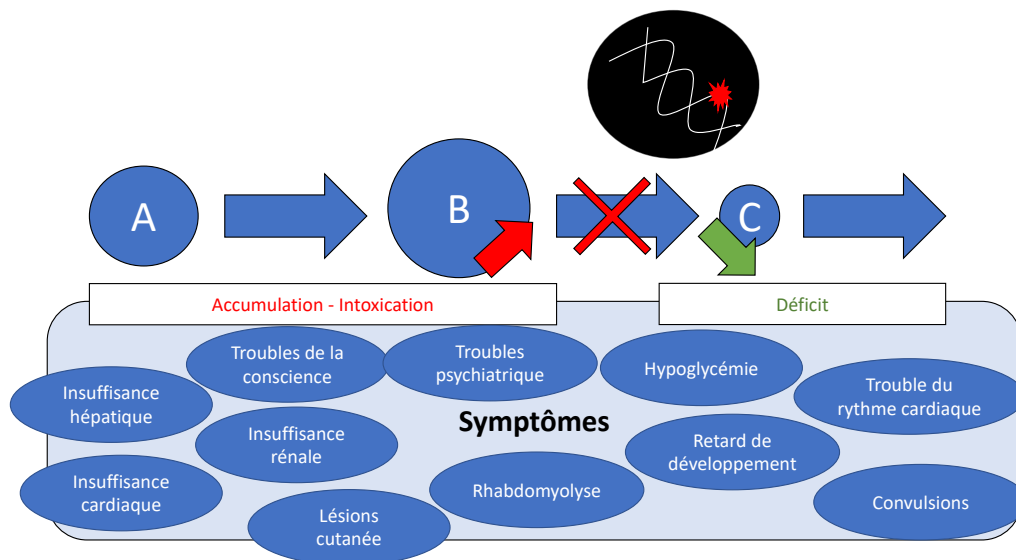


Figure 13. Physiopathologie des erreurs innées du métabolisme s'exprimant sur un mode de transmission monogénique autosomique dominant ou récessif (d'après Wiedemann Réalité Pédiatrique 2023). Dans cet exemple, le déficit touche l'enzyme qui transforme le substrat B en produit C. Il va y'avoir une accumulation du substrat B et de ses dérivés pouvant avoir un effet toxique sur l'organisme. Il y a également un défaut de production du produit C et de ses dérivés, responsable d'un déficit pour l'organisme. Selon que le mécanisme soit toxique ou au contraire lié à un déficit, de nombreux symptômes peuvent s'observer chez les patients.

Il existe plus de 1500 maladies réparties dans 24 groupes de pathologies. Parmi celles-ci, on trouve les aciduries organiques dont fait partie l'acidurie méthylmalonique (99), un désordre du métabolisme intermédiaire. Les déficits enzymatiques sur la voie du métabolisme de la vitamine B₁₂, depuis son internalisation par les récepteurs cellulaires jusqu'à la synthèse des formes actives de cobalamines regroupent les erreurs innées du métabolisme de la vitamine B₁₂ (**Figure 14**) (37).

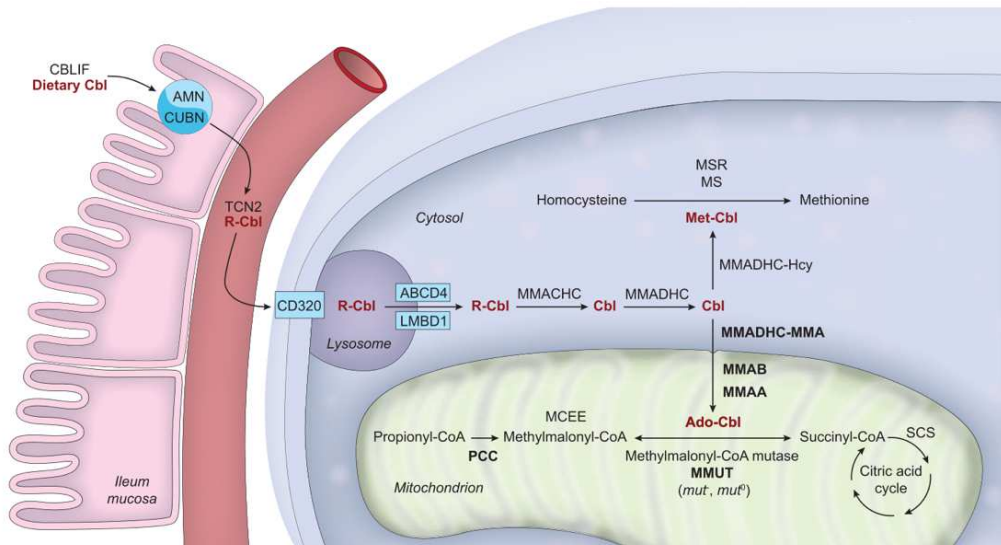


Figure 14. Métabolisme intracellulaire de la vitamine B₁₂. (Forny and al. JIMD 2021).

Historiquement, pour définir le déficit enzymatique, il était réalisé des analyses par complémentation (100). Les fibroblastes prélevés sur le patient suspect d'avoir une erreur innée du métabolisme de la vitamine B₁₂ sont fusionnés avec des fibroblastes de patients pour lequel le déficit est connu et caractérisé. La cellule créée est appelée un hétérocaryon. Deux situations sont alors possibles :

- Première situation, les deux mutations touchent des protéines distinctes sur la voie métabolique de la vitamine B₁₂. Les deux anomalies sont différentes, chaque noyau peut pallier le déficit de l'autre cellule. L'activité enzymatique globale dans l'hétérocaryon est restaurée permettant l'utilisation de la vitamine B₁₂. On conclut que les deux cellules sont complémentaires pour la voie métabolique considérée. On dit qu'il y a complémentation.
- Deuxième situation, l'activité enzymatique n'est pas restaurée dans l'hétérocaryon, les deux cellules présentent un déficit sur la même protéine. L'information génétique de l'une ne peut compenser l'autre au sein de l'hétérocaryon.

De cette manière, il est possible de définir des groupes de complémentation caractéristiques des différentes étapes du métabolisme de la vitamine B₁₂. L'évaluation se fait par dosage biochimique des intermédiaires issus du métabolisme du ¹⁴propionate. En 2022, 19 gènes ont été rapportés comme associés à une anomalie du métabolisme de la vitamine B₁₂ (**Table 5**) (101).

Table 5. Listes des 19 gènes associés à une erreur innée du métabolisme de la vitamine B₁₂ (d'après Watkins et Rosenblatt, 2022).

Pathologie	Phénotype OMIM	Gène	Localisation du gène	Numéro du gène
Déficit du facteur intrinsèque	261000	<i>CBLIF</i>	11q12.1	609342
Syndrome d'Imerslund-Gräsbeck de type 1	261100	<i>CUBN</i>	10p13	602997
Syndrome d'Imerslund-Gräsbeck de type 2	218882	<i>AMN</i>	14q32.32	605799
Déficit en transcobalamine	275350	<i>TCN2</i>	22q12.2	613441
Déficit en haptocorrine	193090	<i>TCN1</i>	11q12.1	189905
Déficit du récepteur de la transcobalamine	613646	<i>CD320</i>	19p13.2	606475
Acidurie méthylmalonique de type <i>cbIA</i>	251100	<i>MMAA</i>	4p31.21	607481
Acidurie méthylmalonique de type <i>cbIB</i>	251110	<i>MMAB</i>	12q24.11	607568
Acidurie méthylmalonique et homocystinurie de type <i>cbIC</i>	277400	<i>MMACHC</i>	1p34.1	609831
Acidurie méthylmalonique et homocystinurie de type « Epi- <i>cbIC</i> »	277400	<i>PRDX1</i>	1p34.1	176763
Acidurie méthylmalonique et homocystinurie de type <i>cbID</i>	277410	<i>MMADHC</i>	2q23.2	611935
Déficit en méthylcobalamine type <i>cbIE</i>	236270	<i>MTRR</i>	5p15.31	602568
Acidurie méthylmalonique et homocystinurie de type <i>cbIF</i>	277380	<i>LMBRD1</i>	6q13	612625
Déficit en méthylcobalamine type <i>cbIG</i>	250940	<i>MTR</i>	1q43	156570
Acidurie méthylmalonique et homocystinurie de type <i>cbIJ</i>	614857	<i>ABCD4</i>	14q24.3	603214
Acidurie méthylmalonique et homocystinurie de type <i>cbIX</i>	309541	<i>HCFC1</i>	Xq28	300019
Déficit en <i>THAP11</i>	/	<i>THAP11</i>	16q22.1	609119
Déficit en <i>ZNF143</i>	/	<i>ZNF143</i>	11p15.4	603433
Acidurie méthylmalonique, type MUT	251000	<i>MMUT</i>	6p12.3	609058

1.3.5 Défauts génétiques de l'absorption intestinale de la vitamine B₁₂

Les premières étapes de la voie métabolique correspondent à la dissociation de la cobalamine des protéines animales, de sa protection dans le milieu gastrique acide par le facteur intrinsèque, puis de son absorption via le récepteur cubam.

1.3.5.1 Déficit du facteur intrinsèque

Le déficit en facteur intrinsèque (FI) est une pathologie rare correspondant à l'absence de synthèse ou de sécrétion du facteur intrinsèque. Elle s'exprime sur un mode autosomique récessif. Le FI, codé par le gène *GIF*, est une protéine de 417 acides aminés (102, 103). Une mutation sur le gène peut être associée à une diminution de synthèse, une diminution de l'affinité pour la cobalamine ou une augmentation de sa sensibilité à la protéolyse gastrique (104). Une vingtaine de variants pathogènes ont été rapporté jusqu'ici, pour une centaine de cas décrits dans la littérature (101).

Les premières descriptions datent des années 1960 et rapportent le cas d'enfants avec une anémie pernicieuse, sans anomalie de la muqueuse gastrique, une absence de facteur intrinsèque dans le liquide gastrique, et l'absence de mise en évidence d'anticorps (105, 106). L'anémie pernicieuse juvénile « congénitale » est décrite l'année suivante (107). Il n'existe pas de protéinurie dans ce syndrome, l'atteinte est due à une malabsorption sélective de la vitamine B₁₂ au niveau digestif. Les signes cliniques surviennent généralement dans la petite enfance, une fois les réserves constituées in-utéro épuisées. Il s'agit d'une anémie mégalo-blastique, responsable d'asthénie, avec une atteinte du système nerveux périphérique (paresthésie, neuropathie périphérique, ataxie) (108). Le traitement repose sur l'injection intramusculaire hebdomadaire ou mensuel d'hydroxocobalamine.

1.3.5.2 Syndrome d'Imerslund-Gräsbeck

Le syndrome d'Imerslund-Gräsbeck est une pathologie autosomique récessive due à une mutation du complexe AMN/CUBN, formant le récepteur cubam au niveau de la membrane iléale (109). Il a été décrit initialement dans les pays scandinaves, où sa prévalence est de 1/200.000 naissances. Il se manifeste après les premiers mois de vie par une anémie macrocytaire associée à des troubles de la croissance, des infections et une protéinurie (110). Des troubles neurologiques ont également été rapportés (111). Il a été observé plusieurs malformations associées des voies urinaires (112).

La pathologie est soit due à une mutation du gène *CUBN*, situé sur le chromosome 10p12.1, soit une mutation du gène *AMN*, situé sur le chromosome 14p32 (113). Il est intéressant de souligner qu'il n'a pas été observé de malformation urinaire en cas de mutation du gène *CUBN*, mais uniquement en cas de mutation d'*AMN*, soulignant le rôle important de la protéine au moment de la gastrulation (110). Une mutation d'une de ces deux protéines est responsable d'une diminution de l'affinité du récepteur pour le complexe IF-B₁₂ et donc une diminution de son absorption. Le traitement repose sur l'administration de vitamine B₁₂ par voie intramusculaire, au rythme d'une injection par mois durant toute la vie du patient. En cas de supplémentation, le pronostic est excellent, seul persiste la protéinurie sans conséquence sur la fonction rénale (110).

1.3.6 Défaut du transport de la vitamine B₁₂

Dans le sang, la cobalamine circule pour 10 à 20% liée à la transcobalamine (TCII), qui peut être internalisée par la totalité des cellules exprimant le CD320. Le reste de la cobalamine est fixée à l'haptocorrine reconnue uniquement par les cellules hépatiques.

1.3.6.1 Déficit en haptocorrine

L'haptocorrine, anciennement appelée transcobalamine I, est une protéine de 433 acides aminés, codée par le gène *TCN1*, situé sur le chromosome 11. La symptomatologie en cas de déficit reste discutée. Une cinquantaine de patients ont été rapportés, souvent diagnostiqués de manière fortuite dans les suites de la découverte d'un taux plasmatique de vitamine B₁₂ bas (114).

La première description dans la littérature rapporte l'histoire de 2 frères, qui à l'âge adulte présentait un taux plasmatique de vitamine B₁₂ abaissé, en lien avec l'absence d'haptocorrine dans le sérum, la salive, le liquide cérébro-spinal et le liquide gastrique (115). Ce déficit n'avait alors pas de répercussion clinique. Néanmoins quelques années plus tard, il a été décrit chez un des frères une dégradation neurologique progressive à type de paraparésie spastique et de démence, sans autre étiologie retrouvée. Elle était non améliorée par l'injection de cobalamine et non présent chez les autres membres de sa famille (116). L'impact du déficit en haptocorrine sur le développement d'une symptomatologie neurologique reste donc discutable.

1.3.6.2 Déficit en transcobalamine

Le déficit en transcobalamine, également appelé déficit en TCII (**Figure 15**), est une pathologie autosomique récessive qui se révèle classiquement durant les premiers mois de vie. La transcobalamine est une protéine de 43 kDa codée par le gène *TCN2*, situé sur le bras long du chromosome 22 (22q11.1) (117).

Les signes cliniques regroupent perte de poids, retard de croissance staturo-pondérale, diarrhées, vomissements, léthargie, irritabilité, pâleur et ulcères de la muqueuse buccale. Des infections sévères (notamment à *Pneumocystis carinii* ou méningites à *Streptococcus Pneumoniae* et *Escherichia coli*) sont rapportées au cours de la première année de vie (118, 119). Ces infections sont dues à un déficit immunitaire par hypogammaglobulinémie (120). Sur le plan biologique, il est noté une accumulation d'homocystéine et d'acide méthylmalonique tandis que la concentration en méthionine peut être diminuée. Les patients présentent un taux de cobalamine sérique et totale abaissé.

Le traitement a pour objectif de maintenir un taux de cobalamine sérique élevé (1000 – 10000 pg/ml) préférentiellement par l'injection hebdomadaire de CNCbl ou d'OHCbl par voie intramusculaire (**Figure 16**). Le déficit en TC est une maladie sévère dont le pronostic est favorable grâce au traitement (118).

1.3.6.3 Déficit du récepteur de la transcobalamine (CD320).

Le déficit du récepteur de la transcobalamine est une pathologie autosomique récessive rare due à une mutation sur le récepteur de la TC. Le récepteur de la TC est une glycoprotéine de 282 acides aminés, codé par le gène *CD320* (121), situé sur le chromosome 19 (19p13.2). Les patients rapportés présentent sur le plan biologique une excrétion d'acide méthylmalonique modérément augmentée avec un taux d'homocystéine normal ou élevé. Sur le plan clinique, les patients rapportés sont le plus souvent asymptomatiques malgré les anomalies biologiques. Néanmoins des cas d'altération sévère de la vision par occlusion de l'artère de la rétine, secondaire à l'hyperhomocystéinémie ont été décrit (122).

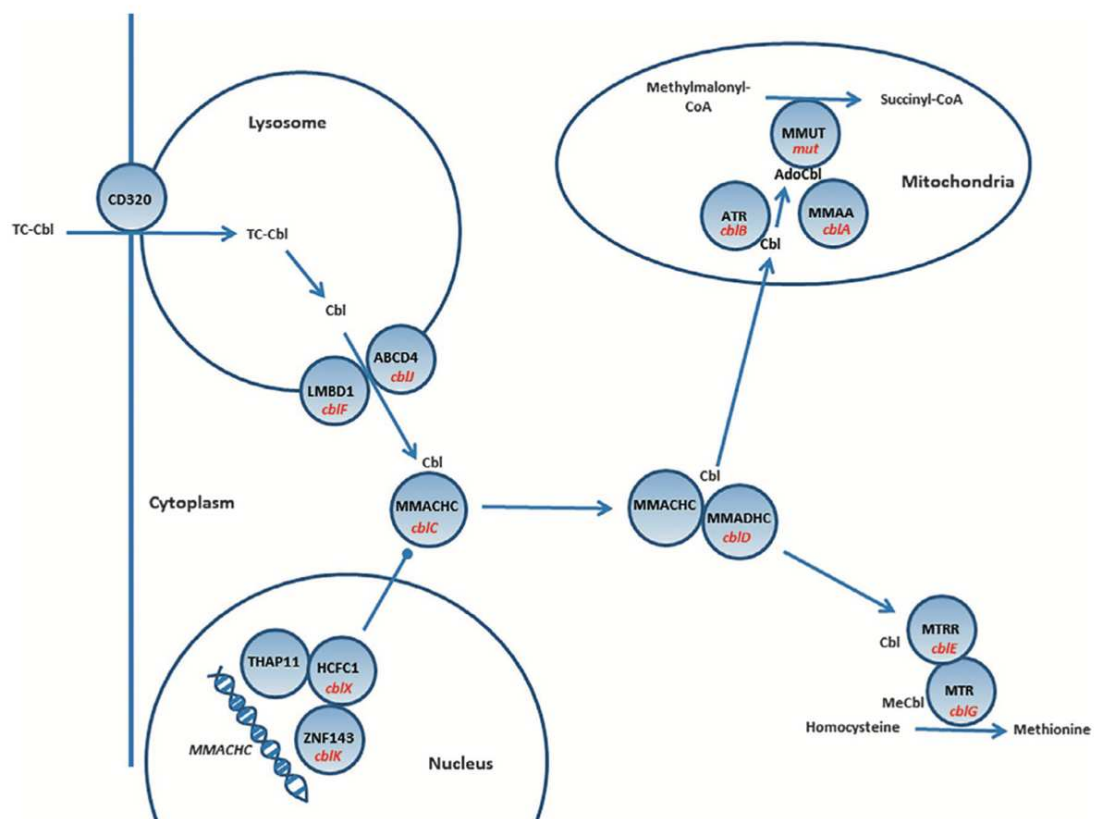


Figure 15. Groupes de complémentation des déficits intracellulaires de la vitamine B₁₂ (d'après Watkins and Rosenblatt, Vitamins and Hormones 2022). Gènes impliqués dans le métabolisme intracellulaire de la vitamine B₁₂ avec groupe de complémentation associé (en rouge) en cas de mutation du gène décrit.

1.3.7 Déficit du métabolisme intracellulaire affectant la voie de synthèse de la méthylcobalamine et de l'adénosylcobalamine

Une fois internalisée dans la cellule, la cobalamine transite d'abord via le lysosome avant plusieurs réactions chimiques intracytoplasmiques permettant la suppression du radical en position supérieure. Une fois ces étapes réalisées, la cellule synthétisera les formes AdoCbl ou MetCbl, biologiquement actives.

1.3.7.1 Anomalies de la sortie du lysosome

Les premières étapes du métabolisme intracellulaire correspondent à la sortie de la cobalamine du lysosome. Deux protéines, découvertes via deux groupes de complémentation différents, sont impliquées dans cette étape : la protéine LMBD1, codée par le gène *LMBD1*, correspondant au groupe de complémentation *cbIF* (58) et la protéine ABCD4, codée par le gène *ABCD4*, correspondant au groupe de complémentation *cbIJ* (59) (**Figure 15**).

1.3.7.1.1 Mutation de LMBD1 - Groupe de complémentation cbIF

Il s'agit d'une pathologie de transmission autosomique récessive très rare. En effet, moins de 20 cas ont été rapportés dans la littérature. En cas de mutation sur la protéine LMBD1, la cellule est incapable de transférer la cobalamine libérée dans les lysosomes vers le cytosol. La cobalamine s'accumulant dans les lysosomes, elle ne peut être convertie en AdoCbl ou MeCbl, les activités enzymatiques de MS et MMUT sont donc fortement diminuées. La protéine LMBD1, codée par le gène *LMBD1*, présent sur le chromosome 6, possède 9 domaines transmembranaires (58).

Les signes cliniques rapportés chez les patients sont très variables : retard de développement, troubles digestifs, anémie mégaloblastique (pâleur, fatigue, anorexie), hypotonie, stomatite et rashes cutanés. Les premiers signes cliniques apparaissent entre les premiers mois de vie jusqu'à leur première décennie (58, 123-125). Sur le plan biologique, du fait de l'anomalie de fonctionnement des enzymes MS et MMUT, les patients présentent une anémie mégaloblastique ainsi qu'une hyperhomocystéinémie, une acidémie et une acidurie méthylmalonique. Le taux de méthionine est normal ou abaissé.

Le traitement repose sur l'administration intramusculaire de cobalamine, ainsi qu'une supplémentation orale en bétaine. Il semble stabiliser voire améliorer le pronostic neurocognitif des patients traités (126) (**Figure 16**).

1.3.7.1.2 Mutation de ABCD4 - Groupe de complémentation cblJ

ABCD4 est une protéine de 68.6 kDA, membre de la famille D des transporteurs ATP binding cassette (ABC), codée par le gène *ABCD4*, situé sur le chromosome 14q24.3 (59). Il s'agit d'une pathologie à transmission autosomique récessive. Très peu de patients ont été décrit dans la littérature (59, 127-130). Cliniquement les patients rapportent principalement des troubles neurologiques (hypotonie, léthargie), des difficultés alimentaires, des anomalies cardiovasculaires congénitales, une hyperpigmentation ou une anémie macrocytaire.

Biologiquement, du fait de la séquestration de la cobalamine dans le lysosome, les activités de MS et de la mutase sont très fortement abaissées. Les patients présentent logiquement une hyperhomocystéinémie, une hypométhioninémie et un taux élevé de méthylmalonate dans le sang et les urines.

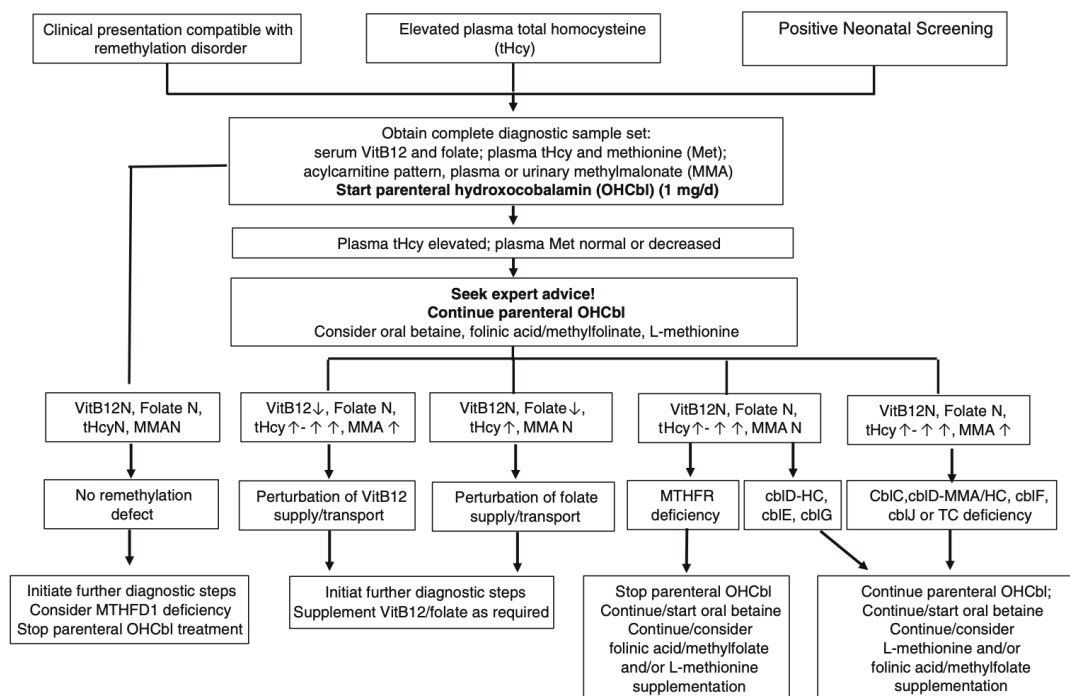


Figure 16. Algorithme de prises en charge thérapeutiques des erreurs innées du métabolisme intracellulaire de la vitamine B₁₂ (d'après Huemer and al., J Inherit Metab Dis 2016). Recommandations de prise en charge diagnostique et thérapeutique, avant et après dosage biochimique spécifique.

1.3.7.2 MMACHC – groupe de complémentation *cbIC*

Dans le spectre des erreurs innées du métabolisme de la vitamine B₁₂, la pathologie la plus fréquemment rapportée est l'acidurie méthylmalonique avec hyperhomocystéinémie due à une mutation du gène *MMACHC*, avec plus de 1200 patients rapportés en 2022 (101). Le gène *MMACHC*, localisé sur le chromosome 1 (locus 1p34.1) permet de coder la protéine MMACHC (131) qui joue un rôle de chaperon dans l'utilisation de la vitamine B₁₂ par la cellule (71). De nombreux variants génétiques ont été rapportés dans la littérature, avec des variations de fréquence selon l'origine ethnique des patients. La mutation c.271dupA est la plus fréquente dans les populations européennes par exemple, alors que la c.609G>A est plus fréquente dans la population chinoise (132).

MMACHC intervenant dès la sortie de la vitamine B₁₂ du lysosome, les deux voies de synthèse celle de l'AdoCbl et celle de la MeCbl sont donc impactées. Une diminution d'activité de la méthylmalonyl-CoA mutase et de la méthionine synthase est observée dans les fibroblastes de patients (101). Mais à la différence des déficits *cbIF* et *cbIJ*, en cas de mutations du gène *MMACHC*, le taux de cobalamine intracellulaire est très abaissé. Le groupe de complémentation lié à un déficit en MMACHC est le groupe *cbIC* (**Figure 15**).

L'expression clinique d'un déficit de la protéine MMACHC est très variable. Elle est schématiquement séparée en early-onset, lors d'une expression clinique dès la première année de vie et en late-onset, lors d'une expression clinique plus tardive (126, 133-136). Dans les formes infantiles, il est fréquemment rapporté des anémies mégaloblastiques, des retards de croissance, des difficultés alimentaires et une somnolence. L'atteinte neurologique se manifeste par une épilepsie, associée à un retard du développement psychomoteur, voire une régression, une microcéphalie ainsi qu'une atrophie cérébrale et/ou cérébelleuse avec une atteinte de la substance blanche. Une atteinte ophtalmologique est également fréquemment rapportée avec une atrophie du nerf optique, un strabisme, un nystagmus, une rétinopathie poivre et sel ainsi qu'une maculopathie (137). Dans les formes late-onset, les atteintes neurologiques sont au premier plan avec une régression psychomotrice, des troubles de la marche, une épilepsie, mais également des troubles psychiatriques comme des démences ou des psychoses.

Dans les deux formes il a été rapporté des processus de type microangiopathie thrombotique responsables de syndrome hémolytique et urémique atypique, possiblement secondaire à l'hyperhomocystéinémie, associé ou non à des tableaux d'hypertension artérielle pulmonaire pouvant causer le décès du patient (138). Des cas de cardiopathies congénitales ont également été rapporté (139).

Le traitement de cette pathologie repose sur l'administration parentérale de fortes doses d'hydroxocobalamine, la forme cyano- semblant moins efficace (140). Un traitement par bétaine, permettant la conversion d'homocystéine en méthionine via la bétaine-homocystéine méthyltransférase, est également recommandé (**Figure 16**). Des cas d'amélioration clinique après supplémentation en méthionine ont été rapportés (141). Des supplémentations en L-carnitine, acide folique ou acide carginique sont parfois réalisées sans démonstration d'un effet clinique évident (101). Un régime limité en protéine n'est pas nécessaire (142, 143). Malgré un traitement métabolique bien conduit, il persiste une symptomatologie neurologique et/ou ophtalmologique (101, 126). Des résultats prometteurs de traitement durant la période anténatale ont été rapporté (144).

1.3.7.3 Épimutation du gène *MMACHC* - *Epi-cblC*

Plusieurs patients diagnostiqués comme ayant un déficit de type *cblC* n'ont pas eu de réponse génétique avec une absence de mutation identifiée sur le gène *MMACHC*. Il a été rapporté une forme *épi-cblC*, due à une épimutation du gène *PRDX1* (145). La découverte de cette mutation est une grande avancée dans le diagnostic des maladies rares, puisqu'elle a permis de mettre en exergue la possibilité d'épimutation comme responsable de phénotype autosomique récessif, avec une transmission mendélienne.

Sur le plan physiologique, cette mutation a notamment été découverte grâce à l'absence de mutation sur le gène *MMACHC*, chez une patiente décédée d'une forme sévère de *cblC*, chez qui n'avait été mis en évidence qu'une mutation hétérozygote sur le gène de transmission maternelle (c.271dupA). Aucun autre ARNm que celui résultant de cette mutation n'a été observé dans les fibroblastes de la patiente, notamment le transcrit non-muté de transmission paternelle. Une analyse de la méthylation du gène *MMACHC* a permis de mettre en évidence, une hyperméthylation d'îlots CpG au niveau du promoteur et du premier exon du gène *MMACHC* (Chr1:45,965,587–45,966,049). Cette hyperméthylation de transmission paternelle a été retrouvée au niveau sanguin, mais aussi dans les gamètes paternels. Un traitement des fibroblastes par 5-azacytidine (5-AZA), qui permet l'inhibition des DNA méthyltransférases, a permis d'observer le transcrit *MMACHC* non muté dans ces fibroblastes. Cela a permis de confirmer l'hyperméthylation comme responsable de l'absence de synthèse de l'allèle non-muté de transmission paternelle (**Figure 17**).

Cette épimutation est due à une mutation du gène *PRDX1*, dont la transcription se fait de manière antisens. La mutation est responsable d'une anomalie d'épissage de l'exon 6 du gène *PRDX1* et d'une transcription polyA terminale. Ce transcrit entraîne l'hyperméthylation du promoteur du gène *MMACHC* et donc de son absence de transcription par la cellule. Sur le plan clinique les patients porteurs d'une pathologie de type *épi-cblC* présentent le spectre clinique des patients ayant un déficit de type *cblC*, mais avec une forme plus sévère, qui pourrait s'expliquer par l'absence complet de synthèse de la protéine *MMACHC* (145, 146).

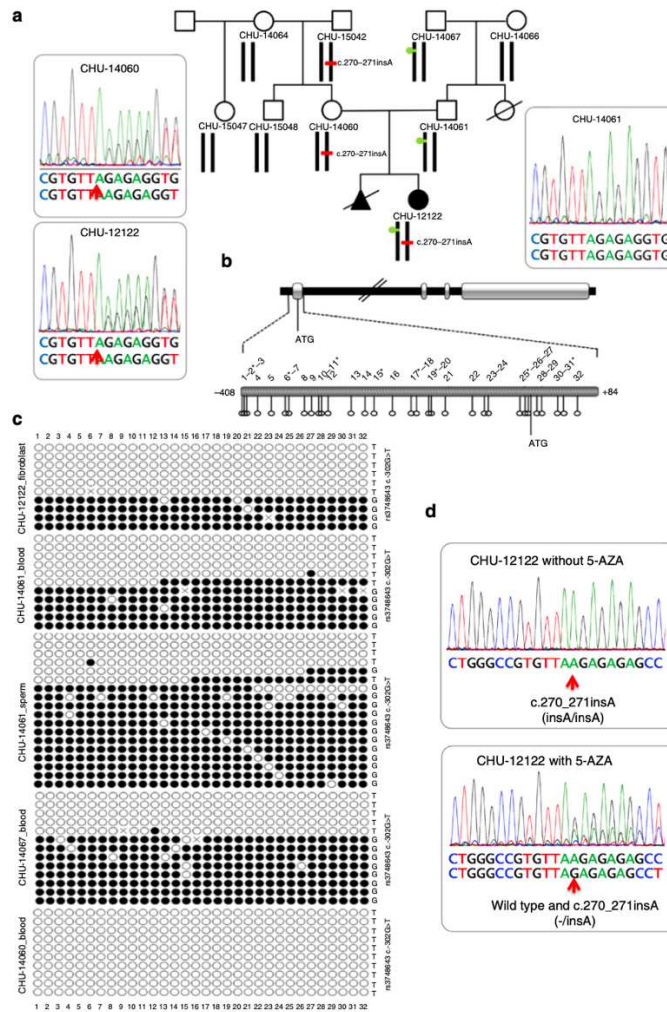


Figure 17. Description du cas CHU-12122 d'épi-cblC hétérozygote composite pour une mutation codante et une épimutation de *MMACHC* détectée dans 3 générations (d'après Guéant and al., Clin Epigenetics 2021). **A.** Arbre généalogique du cas CHU-12122 ; la barre rouge représentation la mutation c.270dupA (p.Arg91LysfsTer14) mis en évidence chez le patient, sa mère et le grand-père maternel ; le cercle vert correspond à l'épimutation au niveau du promoteur / exon 1 du gène *MMACHC* retrouvé dans le cas index. **B.** Cartographie du gène *MMACHC* avec détails des nombreux îlots CpG couvrant le promoteur et l'exon 1. Les sites CpG sont numérotés en fonction de leur position en amont et en aval d'ATG. Les astérisques indiquent les sites CpG de l'îlot CpG qui ont été identifiés par la puce HM450K Illumina. **C.** Épigrammes de la méthylation de *MMACHC* analysée par amplification par PCR/clonage/ séquençage Sanger de l'ADN traité par bisulfite. Des épimutations ont été détectées chez le cas index, son père et son grand-père paternel. **D.** Résultats de RT-PCR issu des fibroblastes du cas CHU-12122 avant et après traitement par 10 μ M de 5-azacytidine (5-AZA). L'absence d'expression de l'allèle saine due à l'épimutation est réversée après traitement (expression bi-allélique après traitement).

1.3.7.4 Anomalies de régulation du gène *MMACHC* – *cbIX/cbIK*

Les investigations sur les patients du groupe de complémentation *cbIC* sans mutation sur *MMACHC* et pour lesquels les transcrits sont bien observés en RT-PCR, ont permis de décrire la première pathologie par aberration de régulation d'un gène (101). Les premiers patients rapportés ont une mutation sur le gène *HCFC1*, codant pour la protéine host factor 1 (HF1), localisé sur le chromosome X, d'où le nom de *cbIX* pour les définir (**Figure 15**) (147-149).

HF1 est un co-régulateur qui interagit avec des protéines comme THAP11 et ZNF143, qui elles se lient à l'ADN. Une mutation sur le gène *HCFC1* peut donc avoir un effet sur l'expression de nombreux autres gènes, selon l'endroit de la mutation. Une mutation dans le motif Kelch est associée à une diminution de transcription de *MMACHC* et d'une symptomatologie de type *cbIC*. Sur le plan biochimique, les anomalies sont moins marquées, alors que sur le plan clinique, il est noté des tableaux d'encéphalopathie épileptique très sévère, associés à une microcéphalie et un profond retard du développement. Cette atteinte clinique est également observée en cas d'absence d'altération du métabolisme de la cobalamine (150-152).

Un patient ayant une mutation homozygote sur le gène *THAP11* a été rapporté dans la littérature comme ayant une diminution d'expression du gène *MMACHC* (153). Un déficit sur la protéine THAP11 est associé à une diminution de synthèse de *MMACHC*, par une diminution d'affinité de THAP11 pour le promoteur du gène *MMACHC* (154). Le patient rapporté avait une augmentation du taux d'acide méthylmalonique sans hyperhomocystéinémie. Il a présenté une encéphalopathie épileptique sévère responsable de son décès.

Un patient a été rapporté avec une mutation hétérozygote composite sur le gène *ZNF143* (155), codant pour une protéine de type DNA-binding protein, interagissant avec la protéine *HCFC1*. Le tableau clinique décrit est sévère avec une encéphalopathie épileptique, une surdité, une cécité, une communication inter-ventriculaire. L'enfant est décédé à l'âge de 2 ans d'une détresse respiratoire secondaire à son état général et ses comorbidités. Ce déficit est à l'origine d'un nouveau groupe de complémentation appelé *cbIK* (**Figure 15**). En plus d'une augmentation de l'acide méthylmalonique et de l'homocystéine, il a été observé dans les fibroblastes une accumulation de complexe TC-Cbl, suggérant un déficit plus précoce dès le lysosome (101).

1.3.7.5 MMADHC – groupe de complémentation *cbID*-MMA/HC

Un déficit de la protéine MMADHC est associé au groupe de complémentation *cbID* (**Figure 15**). Ce groupe de complémentation est hétérogène sur sa présentation clinique et biochimique, en raison de la fonction de MMADHC et du type de mutation. En effet, MMADHC va être responsable de l'adressage de la cobalamine soit à la mitochondrie pour la synthèse d'AdoCbl, soit au cytosol pour la synthèse de MeCbl.

MMADHC est codée par le gène *MMADHC*, situé sur le chromosome 2q23.2. Il s'agit d'une protéine de 296 acides aminés et d'un poids moléculaire de 32.9 kDa (66). MMADHC est constituée de plusieurs domaines fonctionnels (65). La portion N-terminale, correspondant aux 118 premiers acides aminés, contient la séquence de ciblage mitochondriale nécessaire à la synthèse d'AdoCbl (156). Les 180 acides aminés de l'extrémité C-terminale de MMADHC sont impliqués dans les deux voies (mitochondriale et cytoplasmique). Deux régions sont impliquées plus spécifiquement dans la voie cytosolique : les résidus 197 à 226 et ceux de 246-259 (63).

Ce code génétique responsable des différents groupements fonctionnels sur MMADHC explique la complexité de ce groupe de complémentation. En effet, les premiers patients rapportés avaient un tableau similaire au groupe de complémentation *cbIC*, avec une augmentation de l'acide méthylmalonique et de l'homocystéine (157). Dans les années qui ont suivi, des patients du groupe de complémentation *cbID* ont été décrits avec soit une acidémie méthylmalonique isolée, soit une hyperhomocystéinémie isolée (158). 3 sous-groupes ont été créés : *cbID*-MMA/HC, *cbID*-MMA et *cbID*-HC, selon l'atteinte décrite par les patients. MMADHC joue donc un rôle prépondérant dans les interactions avec les autres enzymes du métabolisme intracellulaire de la vitamine B₁₂, formant des macrocomplexes nécessaires à la bonne utilisation de la cobalamine par la cellule (71, 159) (**Figure 18**).

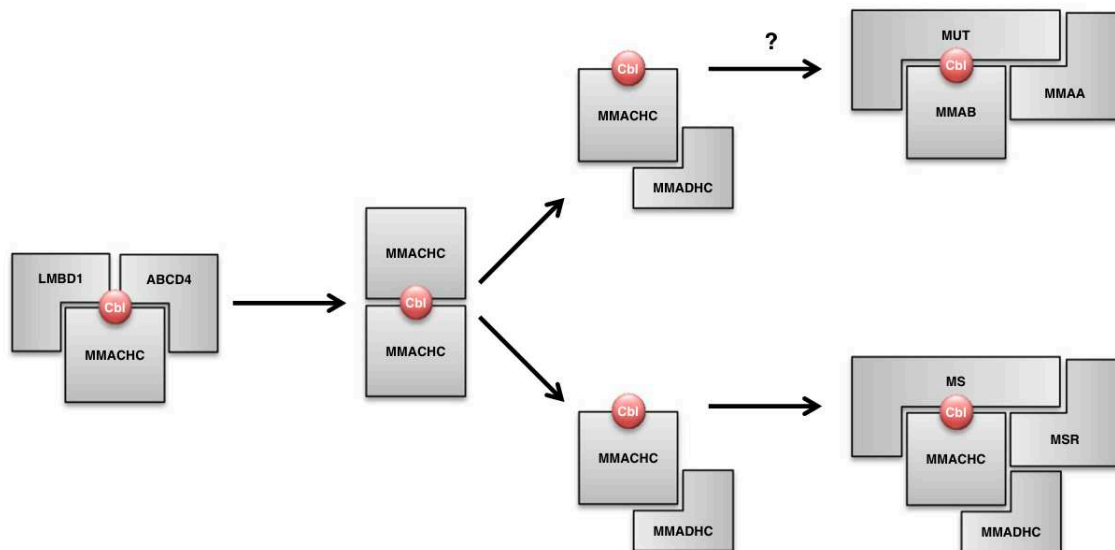


Figure 18. Interactome MMACHC-MMADHC (d'après Bassila and al., BBA 2017). Modèle proposé d'interactions protéine-protéine nécessaire pour la bonne utilisation de la cobalamine par la cellule. Le métabolisme commence par la sortie active du lysosome médié par les protéines LMBD1 et ABCD4. Ces deux protéines vont interagir avec MMACHC qui a notamment un rôle chaperon pour la cobalamine, en plus de permettre la déalkylation et la décyanuration de la cobalamine. L'interaction MMACHC-MMADHC est nécessaire pour l'adressage et la poursuite du métabolisme intracellulaire de la cobalamine. Un interactome avec méthionine synthase et/ou méthionine synthase réductase est possible.

En 2022, un déficit responsable d'une pathologie de type *cbID* a été identifié au sein de 37 familles : 10 familles avec la présentation classique *cbID*-MMA/HC, 9 avec le phénotype *cbID*-MMA et 8 *cbID*-HC (101). Ces manifestations cliniques étaient en lien avec la localisation de la mutation par rapport au domaines fonctionnels précédemment décrits (**Figure 19**).

Les manifestations cliniques varient considérablement entre les patients *cbID*. Les patients *cbID*-MMA/HC présentent un retard de développement, une hypotonie, une léthargie ainsi qu'une anémie mégaloblastique (66, 126). Sur le plan thérapeutique, les recommandations de prise en charge sont les mêmes que pour les déficits de type *cbIC* (**Figure 16**).

B

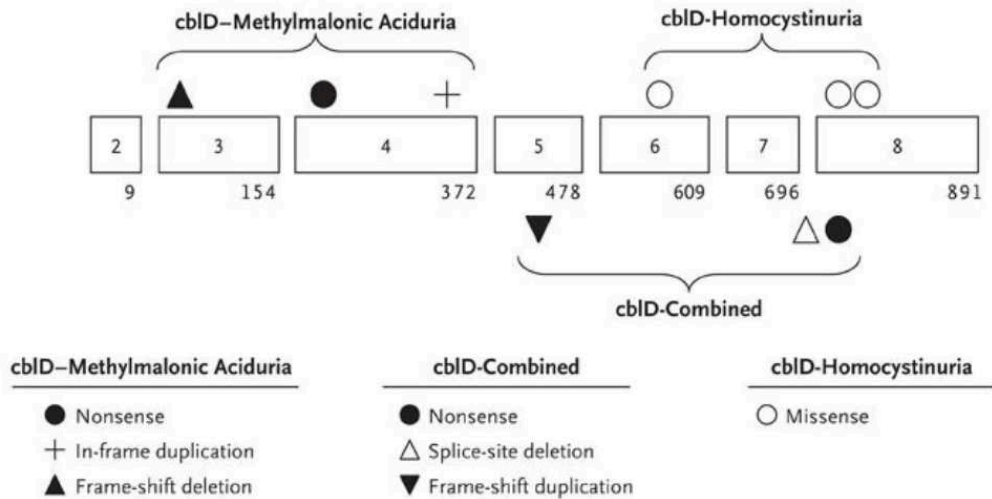


Figure 19. Cartographie et mutations du gène *MMADHC* (Methylmalonic Aciduria, *cbID* Type, and Homocystinuria) (d'après Coelho and al. NEJM 2008). Le gène est constitué de 8 exons. Le schéma représente le cDNA du gène *MMADHC* et localise les mutations selon le phénotype présenté par les patients *cbID*. Les exons sont représentés par des rectangles numérotés et le nombre sous les boîtes indique la position du dernier nucléotide de chaque exon. Le phénotype induit est indiqué selon la position identifiée de la mutation.

1.3.8 Déficit du métabolisme intracellulaire affectant sélectivement la voie de synthèse de la méthylcobalamine

1.3.8.1 Méthionine synthase et Méthionine synthase réductase – groupes de complémentation *cbIG* et *cbIE*

Les déficits des enzymes méthionine synthase et méthionine synthase réductase sont connus depuis la fin des années 1980. Ils ont donc permis la définition de deux groupes de complémentation, respectivement *cbIG* et *cbIE* (160). Sur le plan clinique ces deux déficits sont indissociables.

Méthionine synthase, ou 5-méthyltétrahydrofolate-homocystéine méthyltransférase, est une protéine de 1265 acides aminés et 140 kDa, codée par le gène *MTR* (161, 162). Le gène *MTR* est situé sur le chromosome 1q43 et est composé de 33 exons (163), codant pour le transcrit MTR-001. L'épissage alternatif du gène *MTR* donne lieu à une diversité de transcrits 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 (159).

Méthionine synthase réductase est une protéine impliquée dans la réactivation par reméthylation réductrice de la MS via la SAM comme donneur de groupement méthyle (164). Il s'agit d'une protéine de 698 acides aminés, pour un poids moléculaire de 77.7 kDa, codée par le gène *MTRR* localisé sur le chromosome 5p15.2-15.3 (165, 166).

Environ 50 patients ont été rapportés comme appartenant au groupe de complémentation *cbIG* pour 44 variants de *MTR* connus comme pathologiques. Certains patients sont décrits comme étant *cbIG** en cas d'activité MTR nulle (167). Pour le groupe *cbIE*, environ 35 patients ont été décrits, pour 31 variants pathologiques de *MTRR* (101).

Comme exposé précédemment, méthionine synthase catalyse le transfert d'un groupe méthyle du 5-MTHFR vers une homocystéine, permettant la régénération de la méthionine. Cette réaction est possible grâce à la MeCbl. En effet, le groupement méthyle est initialement transféré depuis 5-MTHFR sur une molécule de cob(I)alamine, permettant la synthèse de metylcob(III)alamine. Le groupement méthyle est alors transféré sur une molécule d'homocystéine, permettant de restaurer une méthionine et une cob(I)alamine (**Figure 20**). Dans environ 1 réaction sur 2000, cette réaction aboutit à la synthèse d'une cob(II)alamine. Cette forme est réduite grâce à une réaction

catalysée par la méthionine synthase réductase (MTRR), permettant de régénérer la forme cob(I)alamine, interagissant avec MTR (168).

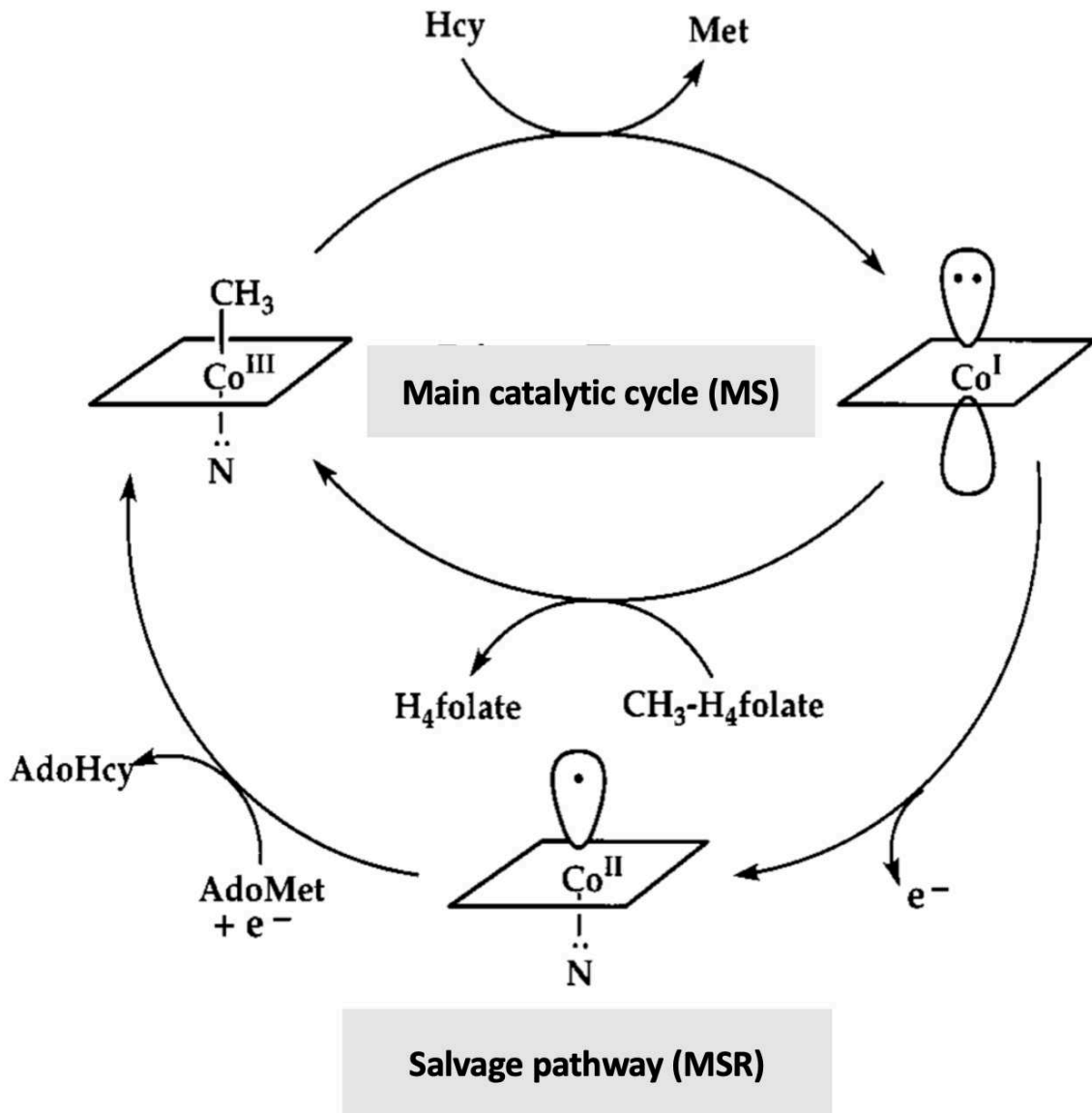


Figure 20. Schéma simplifié de l'action de MTR et MTRR. (d'après Guéant and al. Crit Rev Bioch Mol Biol 2022). Méthionine synthase utilise de la cob(I)alamine pour fixer le groupe méthyle issu du 5MTHFR et régénérer de la méthionine à partir d'homocystéine. Dans la majorité des cas, après la réaction la metylcob(III)alamine revient sous la forme cob(I)alamine. Néanmoins dans une réaction sur 2000, elle s'oxyde sous la forme cob(II)alamine. Dans ce cas, MTRR va permettre de la réduire sous forme cob(I)alamine pour réalimenter le cycle de la méthionine.

Un déficit d'une de ces 2 enzymes aboutit à une augmentation du taux d'homocystéine, plasmatique ou urinaire. Les manifestations cliniques sont similaires et surviennent principalement durant la première année de vie, même si des cas adultes ont été rapportés. Les patients présentent principalement une anémie mégaloblastique ainsi qu'une thrombopénie et une neutropénie. Les troubles neurologiques rapportés sont essentiellement des retards de développement, des épilepsies, des atrophies cérébrales avec microcéphalies, des tableaux d'hypotonie et d'ataxie, de rares cas de syndrome hémolytique et urémique ont été rapporté (101 , 169). Les recommandations de prise en charge proposent des injections d'hydroxocobalamine associées à une prise de citrate de bétaïne pour limiter les taux d'homocystéine (**Figure 16**). Le traitement semble améliorer les paramètres biologiques, mais n'a que peu d'effets sur les manifestations neurologiques (126).

1.3.8.2 MMADHC - groupe de complémentation *cbID*-HC

Comme expliqué précédemment, certaines mutations du gène *MMADHC* peuvent être associées à une augmentation isolée de l'homocystéine (**Figure 18**). Dans ce cas, la mutation n'impacte pas la zone responsable de l'adressage à la mitochondrie. Les patients ayant un déficit de type *cbID*-HC présentent un retard de développement, une ataxie et une anémie mégaloblastique (66).

1.3.9 Déficit du métabolisme intracellulaire affectant sélectivement la voie de synthèse de l'adénosylcobalamine

1.3.9.1 Acidurie méthylmalonique isolée par mutations des gènes *MMUT*, *MMAA* ou *MMAB* - groupe de complémentation respectif : *mut*, *cbIA* et *cbIB*

Sur le plan clinique, ces 3 déficits sont très proches et caractérisés par une augmentation de l'acide méthylmalonique dans le sang et les urines. Ils sont consécutifs à une mutation aboutissant à un défaut de synthèse isolé d'AdoCbl, nécessaire à l'isomérisation intra-mitochondriale du méthylmalonyl-CoA en succinyl-CoA, intermédiaire du cycle de Krebs (**Figure 21**). La synthèse puis l'utilisation d'AdoCbl nécessite le fonctionnement de trois enzymes successives :

- Le groupe de complémentation *cbIB* est dû à une mutation sur le gène *MMAB* (methylmalonic aciduria type B) situé sur chromosome 12q24. Il code pour une protéine, la cobalamine adénosyltransférase (*MMAB* ou *ATR*), protéine de 37.4 kDa (170). Elle catalyse le transfert d'un groupement adénosyle d'une molécule d'ATP vers la cob(I)alamine, dernière étape dans la formation d'AdoCbl. (68, 171, 172).
- La protéine *MMAA*, pour methylmalonic aciduria type A, est codée par le gène *MMAA* situé sur le chromosome 4q31.1-2 (173). *MMAA* est une protéine de 39 kDa avec une activité GTPase (174). Elle joue un rôle de protéine chaperonne et est donc indispensable à la stabilisation du complexe mutase-AdoCbl. Elle permet le transfert de l'AdoCbl de la cobalamine adénosyltransférase (*MMAB*) vers la méthylmalonyl-CoA-mutase.
- La méthylmalonyl-CoA mutase, codée par le gène *MMUT*, situé sur le chromosome 6p21. Ce groupe a été divisé en *mut0* en cas d'absence complète d'activité mutase, et en *mut-* en cas d'activité résiduelle par un variant (101, 175).

En 2022, plus de 400 mutations différentes du gène *MMUT* ont été rapportées, pour plus de 1000 patients. Pour le gène *MMAA* environ 200 patients sont répertoriés pour 80 mutations. Concernant *MMAB*, une centaine de patients sont connus pour 35 mutations différentes.

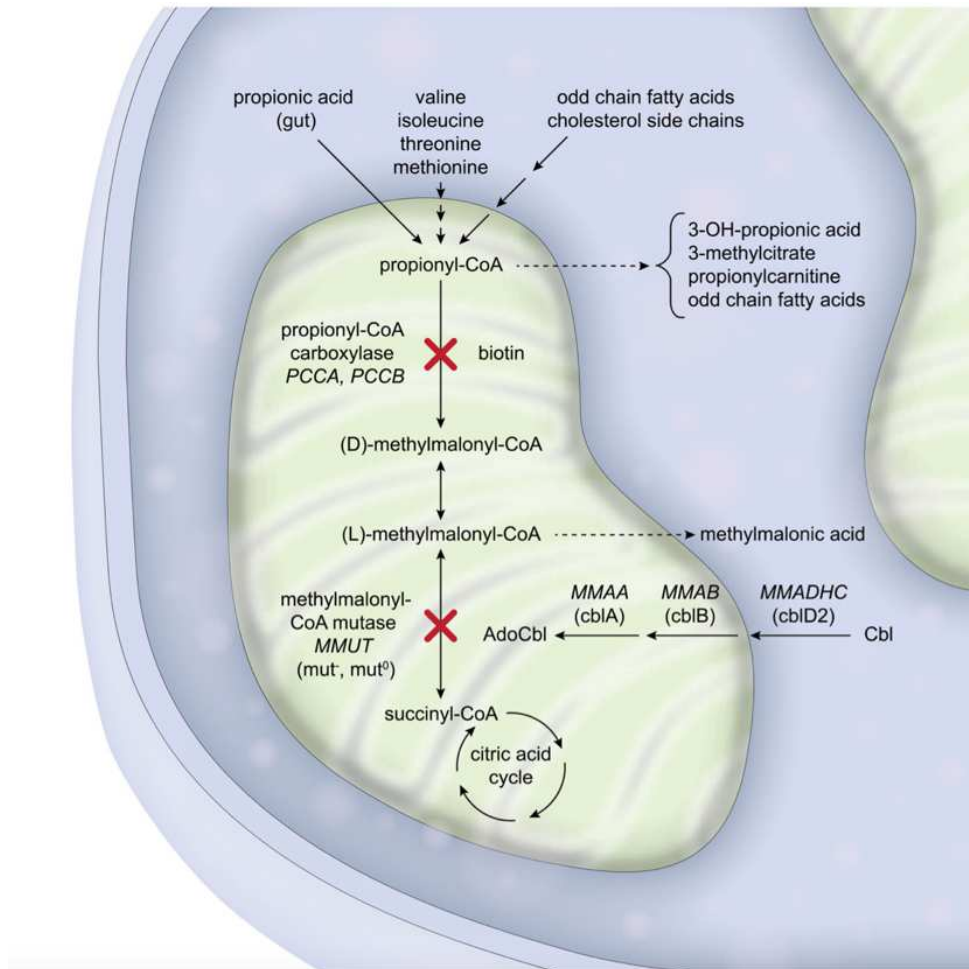


Figure 21. Voie métabolique intra-mitochondriale du propionyl-CoA jusqu'à son entrée dans le cycle de Krebs (d'après Forny and al. JIMD 2021). Le propionyl-CoA est métabolisé dans la mitochondrie par des enzymes spécifiques. Une mutation sur les gènes *MMUT*, *MMAA*, *MMAB* or *MMADHC* est associée à une acidémie méthylmalonique isolée, alors qu'une mutation sur les gènes *PCCA* ou *PCCB* est responsable d'une acidémie propionique. Le propionyl-CoA en excès sera métabolisé en différents produits dans le 3-OH-propionate et le 3-méthylcitrate signant la maladie. Dans le cas de l'accumulation de méthylmalonyl-CoA il sera hydrolysé en acide méthylmalonique signant la maladie.

La majorité des patients présentent une symptomatologie clinique durant le premier mois de vie, voire les premiers jours ou heures. Néanmoins des formes plus tardives ont été rapportées (37, 176, 177). La pathologie se manifeste par une acidose métabolique associée à une hyperammoniémie par défaut de fonctionnement du cycle de l'urée. L'évolution sans traitement va vers une défaillance neurologique puis multi-viscérale mettant en jeu le pronostic vital du patient. Les autres manifestations regroupement des retards de croissance, des retards psychomoteurs, des atteintes rénales jusqu'au stade d'insuffisance rénale terminale. Des atteintes hépatiques allant jusqu'au développement de cancers hépatiques ont également été rapportées (178, 179). Les déficits de type *mut0* et *cb/B* semblent d'expression clinique plus sévère (180-182), excepté pour des atteintes de type accidents neurologiques aiguës qui s'expriment de manière similaire dans tous les déficits (183).

La prise en charge thérapeutique repose, en premier lieu, sur un régime limité en protéine, permettant de contrôler l'apport en acides aminés ramifiés, dont le métabolisme est la première source de méthylmalonyl-CoA. L'acide carnitine permet de compenser le déficit fonctionnel du cycle de l'urée en corrigeant le défaut de disponibilité d'acétyl-CoA (184). L'administration intramusculaire de cobalamine est également proposée. Une supplémentation en carnitine permet d'améliorer la détoxification des dérivés issus du méthylmalonyl-CoA sous leurs formes acyl-carnitines, tout en restaurant le pool de carnitine (176). Enfin, la transplantation hépatique a montré son efficacité sur la diminution de fréquence des accès métaboliques aigus, même si cela ne corrige pas complètement le taux d'acide méthylmalonique ainsi que la survenue de complications neurologiques et rénales à long terme (185-187).

1.3.9.2 MMADHC - groupe de complémentation *cbID-MMA*

Comme expliqué précédemment, certaines mutations du gène MMADHC sont associées à une acidémie méthylmalonique isolée (101). Dans ce cas de figure, la mutation est située sur une portion de la protéine responsable de l'adressage à la mitochondrie (**Figure 18**). Il persiste la portion permettant l'adressage cytosolique, permettant de maintenir la synthèse de MeCbl, et donc le bon fonctionnement de la méthionine synthase.

Sur le plan clinique, les patients du groupe *cbID-MMA* présentent une symptomatologie similaire à celle observée dans les autres aciduries organiques de type MMA, à savoir une décompensation métabolique associée à une détresse respiratoire, une hypotonie musculaire, un retard de croissance, une hémorragie cérébrale et un électroencéphalogramme anormal, sans aucun signe d'anémie mégaloblastique (66).

1.4 Objectifs de la thèse

La connaissance des manifestations cliniques présentées par les patients ayant des erreurs innées du métabolisme de la vitamine B₁₂ est parcellaire. Elle est majoritairement le fruit de registres réalisés sur des cohortes de patients pédiatriques cherchant à évaluer un nombre d'items limités. Cette méconnaissance induit un biais dans la connaissance de ces pathologies et donc dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques qui en sont responsables. L'accessibilité à un diagnostic moléculaire est un prérequis important dans la bonne prise en charge de ces patients, mais également dans l'optique d'une meilleure compréhension de ces pathologies. Une bonne caractérisation des manifestations cliniques permettra d'analyser les différentes manifestations cliniques selon l'âge d'apparition des patients.

Une altération de la vitamine B₁₂ est associée à de nombreuses altérations au sein de la cellule, tant sur le plan génomique que post-génomique. La variabilité sur le plan clinique pourrait notamment s'expliquer par un impact de l'altération du métabolisme intracellulaire de la vitamine B₁₂ sur d'autres voies métaboliques.

Notre travail consiste à étudier l'influence de l'âge et du gène muté sur les manifestations cliniques observées dans le cadre des erreurs innées du métabolisme de la vitamine B₁₂. Nous avons également évalué l'intérêt de réalisation d'un exome clinique par séquençage génétique de nouvelle génération dans le cadre de suspicion de pathologies génétiques comme les erreurs innées du métabolisme de la vitamine B₁₂. Dans des fibroblastes de patients, nous avons analysé l'effet d'un déficit du métabolisme de la vitamine B₁₂ sur d'autres voies métaboliques impliquées dans des pathologies ayant des manifestations cliniques similaires.

Le travail de thèse est divisé en trois études :

Étude N°1

Nous avons réalisé une méta-analyse sur les données individuelles issues de l'ensemble des cas publiés dans la littérature. Nous avons répertorié et classé les manifestations cliniques selon l'âge d'apparition des symptômes et la conséquence fonctionnelle du gène muté. Nous avons pu esquisser des portraits selon l'âge et l'atteinte génétique devant faire discuter la recherche d'une anomalie du métabolisme intracellulaire de la vitamine B₁₂.

Étude N°2

Nous avons analysé les résultats obtenus par la réalisation d'un exome clinique sur une cohorte de 128 patients pédiatriques consécutifs ayant consulté au sein du Centre de Référence des Erreurs Innées du Métabolisme du CHRU de Nancy. Nous avons analysé les éléments associés à une meilleure rentabilité diagnostique selon le groupe de pathologies explorées.

Étude N°3

Nous avons exploré les modifications génomiques et post-génomiques dans des fibroblastes de patients diagnostiqués avec un déficit de type *cb1C*. Nous avons analysé les modifications au niveau du transcriptome, du protéome, du métabolome ainsi que les modifications post-transcriptionnelles des enzymes impliquées dans d'autres voies métaboliques et associées à des pathologies présentant des manifestations cliniques et biologiques également observées dans le cadre des erreurs innées du métabolisme de la vitamine B₁₂.

2 Partie 2 : Méta-analyse sur données individuelles – Description clinique, phénotypique et génétique de 824 patients rapportés dans la littérature avec un déficit du métabolisme intracellulaire de la vitamine B₁₂ génétiquement documenté.

2.1 Introduction

La vitamine B₁₂, aussi connue sous le nom de cobalamine, est une vitamine hydrophile. Elle joue un rôle clé dans différentes fonctions biochimiques fondamentales de l'organisme, telle que la synthèse d'ADN, sa méthylation ou celle des protéines, mais également le métabolisme énergétique mitochondrial. Ces actions sont possibles par l'intermédiaire de ses deux formes actives : la méthylcobalamine – cofacteur de la méthionine synthase (MS) cytosolique – et l'adénosylcobalamine – cofacteur de la méthylmalonyl-CoA mutase (MUT) mitochondriale (188-190). La vitamine B₁₂ n'est pas synthétisée par l'organisme et doit donc être apportée par l'alimentation, notamment d'origine animale (191). L'absorption et le métabolisme de la vitamine B₁₂ est un processus complexe nécessitant de nombreuses étapes, détaillées dans la première partie de ce travail.

De manière succincte, suite à son ingestion, la vitamine B₁₂ est dissociée des protéines animales avant de se lier à l'haptocorrine au niveau de l'estomac. Elle est transférée sur le facteur intrinsèque (FI) dans l'intestin grêle, où l'haptocorrine va être dégradé. Le complexe FI-B₁₂ est absorbé au niveau de l'iléon distal grâce à un récepteur composé des protéines amnionless (codée par le gène *AMN*) et cubiline (codée par le gène *CUBN*). Dans le sang, la vitamine B₁₂ est transportée par l'haptocorrine et la transcobalamine (TCII). Le complexe B₁₂-TCII se lie au récepteur TcblR/CD320, permettant l'endocytose du complexe et l'entrée de la vitamine B₁₂ dans la cellule. La transcobalamine est alors dégradée dans le lysosome et la vitamine B₁₂ est exportée dans le cytosol via les protéines LMBD1 et ABCD4. Dans le cytosol, les protéines chaperonnes, MMACHC et MMADHC, orientent la vitamine B₁₂ vers les voies de synthèse de la MeCbl (dans le cytosol) ou de l'AdoCbl (dans la mitochondrie). Au niveau du cytosol, la MeCbl est nécessaire à la reméthylation de l'homocystéine en méthionine par la MS, grâce à un groupement méthyle issu du méthyltetrahydrofolate (188, 192) La méthionine est le précurseur immédiat de la S-adénosylméthionine, donneur de méthyle universel pour les réactions de méthylation de l'ADN, des histones, et autres protéines et petites molécules (188, 191-193). Au niveau mitochondrial, l'AdoCbl est le cofacteur de la méthylmalonyl-CoA mutase, permettant la conversion de L-méthylmalonyl-CoA en succinyl-CoA, dernière étape de la reconstitution anaplérotique du cycle de Krebs par le catabolisme des acides aminés ramifiés, des acides gras à chaîne latérale à nombre impair de carbone ou de la chaîne

latérale du cholestérol (194). Le rôle essentiel et crucial de la vitamine B₁₂ est mis en lumière par le large spectre des manifestations cliniques observées dans le cadre des erreurs innées du métabolisme de la vitamine B₁₂. Ces pathologies sont dues à une grande variété de gènes impliqués dans l'absorption, le transport et le métabolisme intracellulaire de la vitamine B₁₂.

En 2022, la connaissance de ces pathologies reste parcellaire, notamment au vu de la grande hétérogénéité des manifestations cliniques, biologiques, ou électrophysiologiques. En particulier, il n'existe ni classification ni comparaison des manifestations rapportées selon l'âge des patients ou selon le déficit par une approche fonctionnelle. Pour répondre à cette problématique, nous avons défini 4 clusters fonctionnels de gènes selon leurs fonctions et les conséquences métaboliques en cas de déficit. Ces 4 clusters sont dénommés selon la fonction qu'ils remplissent dans le métabolisme de la vitamine B₁₂, à savoir « Biodisponibilité de la B₁₂ », « Transport cytoplasmique », « Reméthylation » et « Mitochondrie » (**Figure 9**). Nous avons réalisé une revue systématique de la littérature avec une stratégie de recherche très sensible afin de recenser l'ensemble des patients décrits avec une anomalie du métabolisme de la vitamine B₁₂ documentée sur le plan génétique. Nous avons réalisé une méta-analyse pour évaluer les manifestations cliniques, biologiques, et les résultats d'imageries et d'analyse électrophysiologique dans la population étudiée selon 3 catégories d'âge : < 1 an, 1-15 ans et > 15 ans. Nous avons réalisé des études d'association pour évaluer les prédicteurs associés aux catégories d'âge, aux clusters fonctionnels et au risque de décès. Nous avons mis en évidence des manifestations spécifiques selon ces différentes catégories, ce qui permettra de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques associés aux 2 voies métaboliques dépendantes de la vitamine B₁₂. Une meilleure appréhension de ces mécanismes permettra de mieux orienter le diagnostic et la prise en charge de ce groupe complexe de troubles métaboliques héréditaires.

2.2 Matériels et méthodes

2.2.1 Requête électronique de recherche systématique

Nous avons réalisé une recherche parmi la littérature indexée sur MEDLINE®, à l'aide du moteur de recherche PubMed du National Center for Biotechnology Information

(www.pubmed.gov) (Janvier 1966 à Août 2019) pour recenser l'ensemble des cas rapportés de patients ayant une anomalie du métabolisme de la vitamine B₁₂ documentée sur le plan génétique. Nous avons mis au point une requête électronique très sensible, utilisant des mots-clés référencés MeSH (Medical Subject Headings), le thésaurus de référence dans le domaine biomédical, ainsi que des mots de textes libres (par exemple les noms de gènes, groupes de complémentation, nom de maladies métaboliques, enzymes) afin d'élaborer trois panels constituant la recherche électronique. Le **panel #1** comprend l'ensemble des termes en lien avec la vitamine B₁₂, le métabolisme des monocarbone, l'hyperhomocystéinémie ou l'acidurie méthylmalonique. Le **panel #2** regroupe l'ensemble des concepts liés aux maladies génétiques. Le **panel #3** collige quant à lui l'intégralité des termes associés aux erreurs innées du métabolisme. Nous avons construit notre requête afin de recenser l'ensemble des articles associant un mot-clé du Panel#1 à un mot-clé issu du Panel#2 ou du Panel#3, dans le but d'identifier toutes les publications rapportant un patient avec un désordre du métabolisme intracellulaire de la vitamine B₁₂. Les panels sont détaillés dans la **Table 6**. Des articles supplémentaires ont été analysés en cas de présence dans les références des articles sélectionnés par la revue systématique. EndNote X7.8 a été utilisé comme logiciel de gestion bibliographique (Reuters 2013). La revue systématique a été réalisée selon les recommandations MOOSE (Meta-analysis Of Observational Studies in Epidemiology) (195).

Table 6. Electronic search query

<p>1. Panel #1: Vitamin B12 / OCM / Hyperhomocysteinemia / Methylmalonic acidemia</p> <p>("Vitamin B12" OR (Vitamin B 12) OR (B 12, Vitamin) OR (Vitamin B12) OR (B12, Vitamin) OR (Cyanocobalamin) OR (Cobalamins) OR(Cobalamin) OR (Vitamin B-12) OR (Homocysteine) OR (Methylmalonic Acid) OR (Acid, Methylmalonic) OR Methylmalonate OR (Hyperhomocysteinemia) OR (Hyperhomocysteinemias) OR (Methylmalonic acidemia with homocystinuria) OR (Vitamin B 12 Deficiency) OR (Vitamin B12 Deficiency) OR (Deficiency, Vitamin B12) OR (Deficiencies, Vitamin B12) OR (Vitamin B12 Deficiencies) OR (Deficiency, Vitamin B 12) OR (Methylmalonic aciduria cblB type) OR (Methylmalonic acidemia cblB type) OR (Methylmalonic Aciduria, cblB Type) OR (Methylmalonic Acidemia, cblB Type) OR (Methylmalonic aciduria cblA type) OR (Methylmalonic Acidemia, cblA Type) OR (Methylmalonic acidemia cblA type) OR (Methylmalonic Aciduria, cblA Type) OR (Methylmalonic Aciduria due to Methylmalonyl-CoA Mutase Deficiency) OR (Methylmalonic Aciduria, MUT Type) OR (MMA due to MCM Deficiency) OR (Methylmalonic Acidemia due to Methylmalonyl-CoA Mutase Deficiency) OR (Methylmalonic Aciduria, mut(0) Type) OR (Methylmalonic Aciduria, mut(-) Type) OR (Methylmalonic Aciduria and Homocystinuria, CblF Type) OR (Cobalamin, Defect in Lysosomal Release of) OR (Vitamin B12 Storage Disease) OR (Methylmalonic Aciduria due to Vitamin B12-Release Defect) OR (Vitamin B12 Lysosomal Release Defect) OR (Cobalamin F Disease) OR (Methylmalonic Acidemia and Homocystinuria, CblF Type) OR (Methylmalonic Aciduria and Homocystinuria, CblD Type) OR (Methylmalonic Acidemia and Homocystinuria, CblD Type) OR (Methylmalonic Aciduria, CblD Type, Variant 2) OR (Homocystinuria, CblD Type, Variant 1) OR "Methylmalonic Aciduria and Homocystinuria, CblE Type" OR "One-carbon metabolism" OR "Onecarbon metabolism" OR (cblA OR cblA[title]) OR (cblB OR cblB[title]) OR (cblC OR cblC[title]) OR (cblD OR cblD[title]) OR (cblE OR cblE[title]) OR (cblF OR cblF[title]) OR (cblG OR cblG[title]) OR (cblJ OU cblJ[title]) OR (MUT OR MUT[title]) OR (MMUT OR MMUT[title]) OR (ABCD4) OR (AMN) OR (CD320) OR (CUBN) OR (FUT2) OR (FUT6) OR (GIF) OR (LMBD1) OR (LMBRD1) OR (LRP2) OR (MMAB) OR (MMACHC) OR (MMADHC) OR (MTR) OR (MTRR) OR (MUT) OR (TCN1) OR (TCN2) OR (MMAA) OR (ABCC1) OR "imerslund-grasbeck" OR "methionine synthase" OR "methionine synthase reductase" OR "methylmalonyl co-a mutase" OR "cubilin" OR "amnioless" OR "intrinsic factor" OR "transcobalamin" OR "intrinsic factor receptor")</p>
<p>2. Panel #2: Genetic Diseases</p> <p>((Genetic Diseases, Inborn) OR (Disease, Inborn Genetic) OR (Diseases, Inborn Genetic) OR (Genetic Disease, Inborn) OR (Inborn Genetic Disease) OR (Inborn Genetic Diseases) OR (Hereditary Diseases) OR (Hereditary Disease) OR (Disease, Hereditary) OR (Diseases, Hereditary) OR (Genetic Disorders) OR (Disorder, Genetic) OR (Disorders, Genetic) OR (Genetic Disorder) OR (Genetic Diseases) OR (Disease, Genetic) OR (Diseases, Genetic) OR (Genetic Disease) OR (Single-Gene Defects) OR (Defect, Single-Gene) OR (Defects, Single-Gene) OR (Single Gene Defects) OR (Single-Gene Defect))</p>
<p>3. Panel #3: Inborn Errors Metabolism</p> <p>((Metabolism, Inborn Errors) OR (Errors Metabolism, Inborn) OR (Errors Metabolisms, Inborn) OR (Inborn Errors Metabolism) OR (Inborn Errors Metabolisms) OR (Metabolisms, Inborn Errors) OR (Metabolism Errors, Inborn) OR (Error, Inborn Metabolism) OR (Errors, Inborn Metabolism) OR (Inborn Metabolism Error) OR (Inborn Metabolism Errors) OR (Metabolism Error, Inborn) OR (Inborn Errors of Metabolism) OR (Metabolism Inborn Error) OR (Metabolism Inborn Errors))</p>

2.2.2 Sélection des articles

Parmi les articles référencés par la requête, nous avons retenu les articles décrivant de manière individuelle un élément clinique, biologique, électrophysiologique ou une imagerie pour un patient ayant un diagnostic moléculaire d'erreur innée du métabolisme de la vitamine B₁₂. Nous avons exclu : i) les articles non publiés en langue anglaise ; ii) les éditoriaux, revues de la littérature ou résumés de présentation en congrès ; iii) les études rapportant des données agrégées sans données à l'échelle individuelle ; iv) les cas cliniques sans mutations génétiques documentées ; v) les études d'association génétique sur gène candidats ou panel de gènes associés à un déficit de la vitamine B₁₂ ou au métabolisme des monocarbones ; vi) les études sur modèle animal.

2.2.3 Extraction des données

Tous les titres et résumés extraits par la requête ont été analysés par deux investigateurs indépendants, afin de sélectionner ceux répondant aux critères d'inclusion. Dans un second temps, 10 investigateurs indépendants ont analysé les articles sélectionnés sur lecture de l'abstract. Parmi les articles conservés, toutes les données relatives à la description des manifestations présentées par les patients ont été extraites. Les données extraites ont été associées à 10 domaines d'analyse :

- **Domaine #1.** Les **caractéristiques de la publication** (Auteur, année de publication et pays)
- **Domaine #2.** Les **caractéristiques démographiques** du patient (Age, genre)
- **Domaine #3.** Les **manifestations cliniques** rapportées, binarisées selon qu'elles soient décrites comme présentes ou absentes (**Groupe 1** : retard de croissance intra-utérin, microcéphalie ; **Groupe 2** : cardiomyopathie, thrombose ; **Groupe 3** : difficultés alimentaires ; **Groupe 4** : décompensation métabolique aiguë ; **Groupe 5** : maculopathie, rétinopathie, nystagmus ; **Groupe 6** : hypotonie, syndrome pyramidal, syndrome extrapyramidal, troubles de la marche, neuropathie périphérique, convulsion, retard du développement ; **Groupe 7** : hypertension artérielle, insuffisance rénale aiguë, syndrome hémolytique et urémique, insuffisance rénale chronique; **Groupe 8** : anomalie cutanée ; **Groupe 9** : goutte).
- **Domaine #4.** Les **résultats des explorations de laboratoire** : numération formule sanguine ; vitamine B₁₂ (pmol/L) ; méthionine (µmol/L) ; homocystéine

($\mu\text{mol/L}$) ; acide méthylmalonique plasmatique ($\mu\text{mol/L}$) ; C3-carnitine ($\mu\text{mol/L}$) ; ammoniémie ($\mu\text{mol/L}$) ; acide méthylmalonique urinaire (mmol/mol de créatine)].

- **Domaine #5. Diagnostic génétique** selon la nomenclature « Human Genome Variation Society » (HGVS) permettant la description des variants au niveau de l'ADN et des protéines, faisant référence au chromosome selon la nomenclature GRCh37 et la base de données RefSeqGene (Reference Sequence Gene) du National Center for Biotechnology Information (NCBI). La pathogénicité de chaque variant a été annotée par deux investigateurs indépendants selon les recommandations de l'American College of Medical Genetics and Genomics (196) grâce aux logiciels VarSome (197) et ClinVar (198). Nous avons utilisé gnomAD Exomes database (Version : 2.1.1) (199) pour rapporter les fréquences des allèles mutées par rapport à la population générale.
- **Domaine #6. Évaluation électrophysiologique**, exprimée en variable binaire (anomalie électroencéphalographique, anomalie électromyographique).
- **Domaine #7. Imagerie par résonance magnétique**, exprimée en variable binaire (description d'atrophie cérébrale, hypersignal T2 de la substance blanche).
- **Domaine #8. Thérapeutique et évolution du patient**, rapportées selon une variable binaire (supplémentation en vitamine B₁₂, transplantation hépatique, transplantation rénale, décès).

2.2.4 Objectifs de l'étude

Les objectifs de l'étude étaient :

1. Évaluer l'ensemble des variants géniques, des manifestations cliniques, biologiques, des anomalies d'imageries et électrophysiologiques chez l'ensemble des patients rapportés dans la littérature comme ayant une erreur innée du métabolisme de la vitamine B₁₂, selon les catégories d'âge (< 1 an, 1-15 ans, > 15 ans) (200-202) et les clusters fonctionnels de gènes.
2. Rechercher les prédicteurs cliniques, biologiques, électrophysiologiques et d'imagerie significativement associés avec un cluster fonctionnel de gène ou le décès du patient.

2.2.5 Données analysées

Le résultat principal de la revue est de rapporter la fréquence des éléments cliniques, de laboratoire, d'électrophysiologie et d'IRM chez les patients atteints d'une anomalie du métabolisme de la vitamine B₁₂. Les principales variables analysées sont des **variables cliniques** (retard de croissance intra-utérin, microcéphalie, cardiomyopathie, thrombose, difficultés alimentaires, décompensation métabolique aiguë, maculopathie, rétinopathie, nystagmus, hypotonie, syndrome pyramidal, syndrome extrapyramidal, difficultés à la marche, neuropathie périphérique, convulsion, retard de développement, hypertension artérielle, insuffisance rénale aiguë, syndrome hémolytique et urémique, insuffisance rénale chronique, anomalie cutanée et goutte), des **variables biologiques** (vitamine B₁₂, méthionine, homocystéine, C3-carnitine, ammoniémie, acide méthylmalonique plasmatique et urinaire, mutation génétique), des **évaluations électrophysiologiques** (anomalie électroencéphalographique et anomalie électromyographique), des conclusions d'**imagerie par résonance magnétique** (atrophie cérébrale, hypersignal T2 de la substance blanche), le **traitement** et l'**évolution de patients** (supplémentation en vitamine B₁₂, transplantation hépatique, transplantation rénale, décès).

2.2.6 Sélection des gènes pour former les clusters fonctionnels

Nous avons classé les patients au sein de 4 clusters fonctionnels, selon le gène responsable de leur pathologie. Le groupe « Biodisponibilité B12 » comprend les patients ayant une mutation sur les gènes *CBLIF* (alias *GIF*), *CUBN*, *AMN*, *TCN2*, *LMBRD1*, *CD320* ou *ABCD4*. Le groupe « Transport cytoplasmique » regroupe les patients ayant des variants sur les gènes *MMACHC* et *MMADHC* dont les variants sont associés à une atteinte combinée des voies mitochondriales et de la reméthylation (63, 64, 156). Le cluster « Reméthylation » regroupe les patients ayant des variants sur les gènes *MTR*, *MTRR*, et *MMADHC* dont les variants sont associés à une atteinte isolée de la voie de la reméthylation (63, 64, 156). Le cluster « Mitochondrie » regroupe les patients avec des variants sur les gènes *MMAA*, *MMAB* ou *MUT* et ceux ayant des variants sur *MMADHC* responsable d'une atteinte isolée de la voie mitochondriale (63, 64, 156).

2.2.7 Synthèses et analyses des datas

Les variables qualitatives sont exprimées en fréquence et en pourcentage avec leur intervalle de confiance à 95% (95% CI). Les variables quantitatives sont exprimées sous la forme de médiane et d'interquartile (IQR, 25^e et 75^e percentile). Nous avons étudié l'influence de l'âge sur les manifestations rapportées, en utilisant le test de Cochran-Armitage. Nous avons réalisé une régression logistique univariée avec correction de Bonferroni pour évaluer les manifestations cliniques, biologiques, d'imageries et d'électrophysiologies significativement prédictives du clusters de gène « Biodisponibilité B₁₂ » versus les autres clusters fonctionnels, du cluster de gène « Mitochondrie » versus les autres clusters fonctionnels, du cluster « Transport cytoplasmique » versus les autres clusters fonctionnels, du cluster « Remethylation » versus les autres clusters fonctionnels et du cluster « Transport cytoplasmique » versus le cluster « Biodisponibilité B₁₂ ». Pour chaque élément, nous avons reporté le coefficient béta, l'erreur standard et l'odd ratio (OR) avec leur intervalle de confiance à 95% (95% CI). Nous avons également défini les prédicteurs significativement associés avec le risque de décès. Toutes les statistiques ont été réalisé avec le logiciel MedCalc, version 19.5.3 (MedCalc Software, Ostend, Belgium) et SVS (v8.8.1; Golden Helix, Inc., Bozeman, MT, USA).

2.3 Résultats

2.3.1 Revue de la littérature

Comme rapporté dans le diagramme de flux PRISMA (**Figure 22**), la requête a généré 12'614 citations, parmi lesquelles 678 références ont été retenues sur lecture du titre et du résumé. Après lecture des articles, 515 références ont été exclues sur la base des critères d'exclusion, dont 156 en raison de l'absence de diagnostic génétique. Cent soixante-trois articles ont été retenus, permettant de recueillir les données individuelles de 824 patients avec un diagnostic d'erreur innée du métabolisme de la vitamine B₁₂ documentée sur le plan génétique.

2.3.2 Description des 824 patients rapportés avec une erreur innée du métabolisme de la vitamine B₁₂.

Parmi les 824 patients inclus dans la revue systématique, 53% sont de sexe masculin. L'âge médian est de 0,2 année (IQR 0–2,0 ; âges extrêmes 0–59,0) (**Table 7**). Soixante-et-onze pourcent des patients ont moins de 1 an et 10.3% plus de 15 ans. Une mutation du gène *MMACHC* est le plus fréquemment responsable d'une erreur innée du métabolisme de la vitamine B₁₂ (49,6%, 409/824), suivi des gènes *MMUT* (32.6%, 269/824), *MMAA* (6.1%, 50/824) et *MMAB* (3,5% 29/824) (**Table 7**). Les variants génétiques ont été annotés selon la nomenclature HGVS : variants de séquence d'ADN, des séquences protéiques, ainsi que la prédiction de pathogénicité selon la classification ACMG (**Table 8-11**). Les manifestations neurologiques sont les plus fréquemment rapportées, incluant le retard de développement (38,2%, 315/824), l'hypotonie (17,7% 146/824) et les convulsions (10,6% 87/824). Les manifestations digestives sont les deuxièmes plus fréquemment observées. Elles sont rapportées chez 24,9% des patients (205/824). Les décompensations métaboliques aiguës sont observées dans 13,2% des cas rapportés (109/824). Le décès survient dans 13,1% des cas (108/824).

Figure 22. Diagramme de flux PRISMA

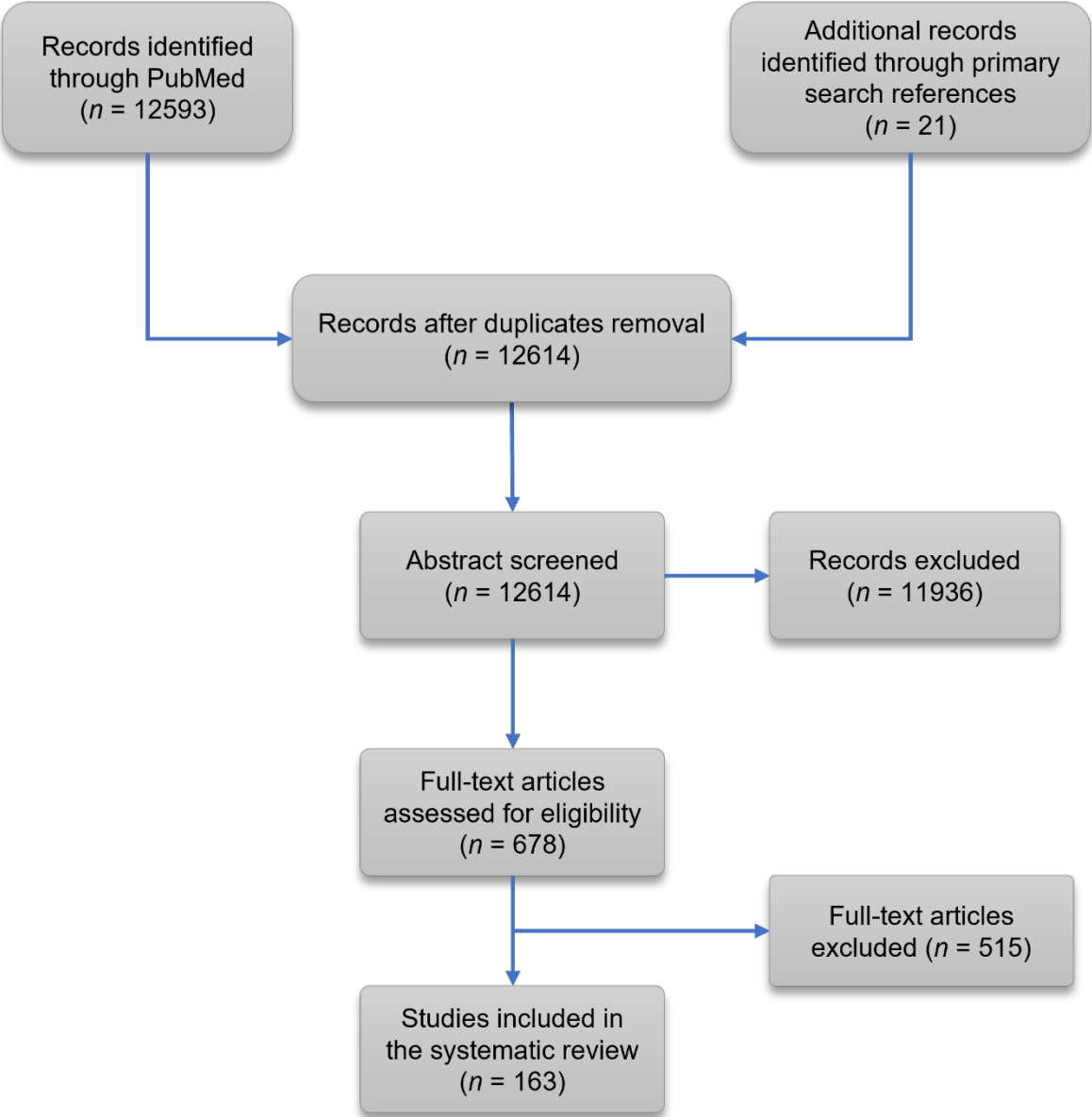


Table 7. Manifestations cliniques, biologiques et résultats d'imageries et d'électrophysiologies rapportées chez les 824 patients inclus.

Données démographique		
Age (années) – n, médiane (IQR; min-max)	716	3.7 (0.2–2; 0–59)
Age, 0 à 1 an – n/N, % (95% CI)	509/716	71.1 (67.8–74.4)
Age, 1 à 14 ans inclus – n/N, % (95% CI)	133/716	18.6 (15.7–21.4)
Age, 15 ans et plus – n/N, % (95% CI)	74/716	10.3 (8.1–12.6)
Sexe masculin – n/N, % (95% CI)	328/620	52.9 (49.0–56.8)
Gene – n/N, % (95% CI)		
<i>MMACHC</i>	409/824	49.6 (46.2–53.1)
<i>MMUT</i>	269/824	32.6 (29.4–35.9)
<i>MMAA</i>	50/824	6.1 (4.4–7.7)
<i>MMAB</i>	29/824	3.5 (2.3–4.8)
<i>MTRR</i>	16/824	2.0 (1.0–2.9)
<i>MMADHC</i>	15/824	1.8 (0.9–2.7)
<i>TCN2</i>	13/824	1.6 (0.7–2.4)
<i>AMN</i>	6/824	0.7 (0.1–1.3)
<i>ABCD4</i>	4/824	0.5 (0.0–0.9)
<i>CBLIF</i> (alias, <i>GIF</i>)	3/824	0.4 (0.0–0.8)
<i>LMRD1</i>	3/824	0.4 (0.0–0.8)
<i>MTR</i>	3/824	0.4 (0.0–0.8)
<i>CUBN</i>	2/824	0.2 (0.0–0.6)
<i>CD320</i>	1/824	0.1 (0.0–0.4)
<i>ZF143</i>	1/824	0.1 (0.0–0.4)
Clusters de gènes* – n/N, % (95% CI)		
Transport cytoplasmique†	416/823	50.5 (47.1–54.0)
Mitochondrie‡	353/823	42.9 (39.5–46.3)
Biodisponibilité de la B ₁₂	32/823	3.9 (2.6–5.2)
Reméthylation§	22/823	2.7 (1.6–3.8)
Signes cliniques		
Manifestations neurologiques – n/N, % (95% CI)		
Retard de développement	315/824	38.2 (34.9–41.6)
Hypotonie	146/824	17.7 (15.1–20.3)
Convulsions	87/824	10.6 (8.5–12.6)
Troubles de la marche	66/824	8.0 (6.2–9.9)
Neuropathie périphérique	64/824	7.8 (5.9–9.6)
Syndrome pyramidal	36/824	4.4 (3.0–5.8)
Syndrome extrapyramidal	30/824	3.6 (2.4–4.9)
Microcéphalie	24/824	2.9 (1.8–4.1)
Manifestations digestive – n/N, % (95% CI)		
Difficultés alimentaires	205/824	24.9 (21.9–27.8)
Défaillance d'organe – n/N, % (95% CI)		
Décompensation métabolique aiguë	109/824	13.2 (10.9–15.5)
Décès	108/824	13.1 (10.8–15.4)
Manifestations ophtalmologique – n/N, % (95% CI)		
Nystagmus	74/824	9.0 (7.0–10.9)
Maculopathie ou rétinopathie	67/824	8.1 (6.3–10.0)
Strabisme	26/824	3.2 (2.1–4.4)
Manifestations rénales – n/N, % (95% CI)		
Pathologies rénales chroniques	58/824	7.0 (5.3–8.8)

Insuffisance rénale aiguë ou SHU	37/824	4.5 (3.1–5.9)
Manifestations psychiatrique – n/N, % (95% CI)		
Psychose	52/824	6.3 (4.7–8.0)
Troubles du comportement	24/824	2.9 (1.8–4.1)
Manifestations cardiovasculaires – n/N, % (95% CI)		
Cardiomyopathie	27/824	3.3 (2.1–4.5)
Hypertension artérielle	21/824	2.6 (1.5–3.6)
Hypertension artérielle pulmonaire	16/824	1.9 (1.0–2.9)
Thromboses	13/824	1.6 (0.7–2.4)
Autres manifestations – n/N, % (95% CI)		
Retard de croissance intra-utérin	15/824	1.8 (0.9–2.7)
Manifestations dermatologiques	7/824	0.8 (0.2–1.5)
Goutte	5/824	0.6 (0.0–1.1)
Grossesse rapportée chez la patiente	4/824	0.5 (0.0–1.0)
Signes biologiques		
Hématologie		
Anémie – n/N, % (95% CI)	108/824	13.1 (10.8–15.4)
Cytopénie – n/N, % (95% CI)	45/824	5.5 (3.9–7.0)
Hémoglobine (g/dL) – n, médiane (IQR)	80	7.8 (6.8–10.4)
Plaquettes (G/L) – n, médian (IQR)	37	158 (83–276)
Globules blancs (G/L) – n, médiane (IQR)	30	5.615 (4.500–7.900)
Biochimie, sang – n, médiane (IQR)		
Homocystéine (µmol/L)	288	92 (54–141)
Méthionine (µmol/L)	136	13.0 (7.1–21.5)
C3 (µmol/L)	105	9.9 (6.9–14.2)
MMA (µmol/L)	94	19 (4–53)
B ₁₂ (pmol/L)	52	389 (171–601)
Ammoniémie (µmol/L)	42	174 (123–350)
Biochimie, urine – n, médiane (IQR)		
MMA (mM/mol créatine)	213	1056 (272–3607)
Imagerie et explorations électrophysiologiques – n/N, % (95% CI)		
IRM cérébrale	175/824	21.2 (19.8–22.7)
Anomalie de signal	89/175	50.1 (43.2–58.5)
Atrophie cérébrale	52/175	29.7 (23.1–37.1)
IRM sans anomalies rapportées	46/175	26.3 (19.9–33.5)
Anomalies EMG	23/824	2.8 (1.7–3.9)
Anomalies EEG (hors crises) ††	17/824	2.1 (1.1–3.0)
Traitement – n/N, % (95% CI)		
Supplémentation en vitamine B ₁₂	316/824	38.3 (35.0–41.7)
Transplantation hépatique	16/824	1.9 (1.0–2.9)
Transplantation rénale	14/824	1.7 (0.8–2.6)

Note. *MMACHC* : Metabolism of cobalamin associated C ; MMA : acide méthylmalonique ; SHU : syndrome hémolytique et urémique ; IRM : imagerie par résonance magnétique ; EEG : électro-encéphalogramme ; EMG : électromyogramme ; IQR : interquartile ; Ref : valeurs de référence.

* Un patient a deux mutations sur le gène *ZNF143* qui n'appartient à aucun groupe fonctionnel de gènes.

† Le cluster de gène « Biodisponibilité B₁₂ » regroupe tous les patients avec des variants sur les gènes *CBLIF* (alias, *GIF*), *CUBN*, *AMN*, *TCN2*, *LMBRD1*, *CD320*, ou *ABCD4*.

‡ Le cluster de gène « Transport cytoplasmique » regroupe tous les patients avec des variants sur les gènes *MMACHC* ou *MMADHC* responsables d'une acidurie méthylmalonique avec hyperhomocystéinémie.

§ Le cluster de gène « Reméthylation » regroupe tous les patients avec des variants sur les gènes *MTR*, *MTRR* ou *MMADHC* responsables d'une hyperhomocystéinémie isolée.

|| Le cluster de gène « Mitochondrie » regroupe tous les patients avec des variants sur les gènes *MMAA*, *MMAB*, *MMUT* ou *MMADHC* responsables d'une acidurie méthylmalonique isolée.

¶ Tracé EEG de fond pathologique hors évènement critique.

Table 8. Description des 70 variants du gène *MMACHC* selon les catégories d'âge, parmi les 409 patients diagnostiqués avec une acidurie méthylmalonique de type *cb1C*.

Variant c.	Variant p.	Classification ACMG	Nombre d'occurrence de l'allèle – N	Age, 0 à 1 an – n (%)	Age, 1 à 14 ans – n (%)	Age, 15 ans et plus – n (%)	Absence de donnée sur l'âge – n (%)
c.270_271insA	p.Arg91LysfsTer	Pathogenic	274	208 (76%)	23 (8%)	20 (7%)	23 (8%)
c.609G>A	p.Trp203Ter	Pathogenic	98	41 (42%)	20 (20%)	19 (19%)	18 (18%)
c.482G>A	p.Arg161Gln	Pathogenic	82	20 (24%)	21 (26%)	38 (46%)	3 (4%)
c.394C>T	p.Arg132Ter	Pathogenic	58	19 (33%)	24 (41%)	11 (19%)	4 (7%)
c.331C>T	p.Arg111Ter	Pathogenic	29	26 (90%)	3 (10%)	-	-
c.656_658del	p.Lys220del	Likely Pathogenic	26	8 (31%)	4 (15%)	9 (35%)	5 (19%)
c.344T>C	p.Ile115Thr	Likely Pathogenic	18	14 (78%)	-	-	4 (22%)
c.328_331delAACC	p.Asn110AspfsTer	Pathogenic	12	9 (75%)	1 (8%)	1 (8%)	1 (8%)
c.567dupT	p.Ile190TyrfsTer	Pathogenic	12	5 (42%)	3 (25%)	2 (17%)	2 (17%)
c.666C>A	p.Tyr222Ter	Pathogenic	12	10 (83%)	2 (17%)	-	-
c.452A>G	p.His151Arg	Likely Pathogenic	9	-	4 (44%)	4 (44%)	1 (11%)
c.457C>T	p.Arg153Ter	Pathogenic	8	6 (75%)	-	1 (13%)	1 (13%)
c.80A>G	p.Gln27Arg	Likely Pathogenic	8	3 (38%)	4 (50%)	1 (13%)	-
c.10_13delAAAG	p.Lys4SerfsTer	Pathogenic	7	3 (43%)	2 (29%)	2 (29%)	-
c.1A>G	p.Met1Val	Pathogenic	7	2 (29%)	2 (29%)	3 (43%)	-
c.276G>T	p.Glu92Asp	Likely Pathogenic	7	-	6 (86%)	-	1 (14%)
c.388_390delITAC	p.Tyr130del	Likely Pathogenic	7	7 (100%)	-	-	-
c.3G>A	p.Met1Ile	Pathogenic	7	3 (43%)	4 (57%)	-	-
c.565C>A	p.Arg189Ser	Pathogenic	7	4 (57%)	-	2 (29%)	1 (14%)
c.547_548delIGT	p.Val183ThrfsTer	Pathogenic	6	5 (83%)	-	-	1 (17%)

c.440G>A	p.Gly147Asp	Pathogenic	5	5 (100%)	-	-	-
c.445_446del	p.Cys149HisfsTer	Pathogenic	5	1 (20%)	1 (20%)	3 (60%)	-
c.481C>T	p.Arg161Ter	Pathogenic	5	4 (80%)	-	1 (20%)	-
c.615C>G	p.Tyr205Ter	Pathogenic	5	4 (80%)	1 (20%)	-	-
c.276G>A	p.Glu92=	Likely Pathogenic	4	2 (50%)	2 (50%)	-	-
c.365A>G	p.His122Arg	Likely Pathogenic	4	-	1 (25%)	3 (75%)	-
c.389A>G	p.Tyr130Cys	Likely Pathogenic	4	1 (25%)	-	3 (75%)	-
c.484G>T	p.Gly162Trp	Likely Pathogenic	4	2 (50%)	2 (50%)	-	-
c.569dupT	p.Ala191ArgfsTer	Pathogenic	4	2 (50%)	-	-	2 (50%)
c.217C>T	p.Arg73Ter	Pathogenic	3	1 (33%)	2 (67%)	-	-
c.347T>C	p.Leu116Pro	Pathogenic	3	1 (33%)	1 (33%)	1 (33%)	-
c.352delC	p.Gln118ArgfsTer	Pathogenic	3	2 (67%)	-	1 (33%)	-
c.354G>C	p.Gln118His	Likely Pathogenic	3	-	3 (100%)	-	-
c.445_446insA	p.Cys149Ter	Pathogenic	3	-	-	-	3 (100%)
c.570_571insT	p.Ala191CysfsTer	Likely Pathogenic	3	-	3 (100%)	-	-
c.608G>A	p.Trp203Ter	Pathogenic	3	3 (100%)	-	-	-
c.81+1G>A	/	Pathogenic	3	2 (67%)	-	1 (33%)	-
c.158T>C	p.Leu53Pro	Likely Pathogenic	2	-	1 (50%)	1 (50%)	-
c.202C>G	p.Gln68Glu	Uncertain Significance	2	-	-	-	2 (100%)
c.218G>T	p.Arg73Leu	Uncertain Significance	2	2 (100%)	-	-	-
c.285dupA	p.Glu96ArgfsTer	Pathogenic	2	1 (50%)	-	-	1 (50%)
c.343A>G	p.Ile115Val	Uncertain Significance	2	2 (100%)	-	-	-
c.388T>C	p.Tyr130His	Likely Pathogenic	2	-	1 (50%)	1 (50%)	-
c.392_394delAAC	p.Gln131del	Likely Pathogenic	2	-	-	2 (100%)	-

c.427C>T	p.Gln143Ter	Pathogenic	2	-	1 (50%)	1 (50%)	-
c.440G>C	p.Gly147Ala	Pathogenic	2	-	-	1 (50%)	1 (50%)
c.442_444delinsA	p.Val148MetfsTer	Pathogenic	2	-	2 (100%)	-	-
c.463G>C	p.Gly155Arg	Likely Pathogenic	2	1 (50%)	-	1 (50%)	-
c.464G>A	p.Gly155Glu	Likely Pathogenic	2	-	2 (100%)	-	-
c.544T>C	p.Cys182Arg	Likely Pathogenic	2	2 (100%)	-	-	-
c.615C>A	p.Tyr205Ter	Pathogenic	2	-	2 (100%)	-	-
c.616C>T	p.Arg206Trp	Likely Pathogenic	2	2 (100%)	-	-	-
c.14_24del	p.Val5GlufsTer	Pathogenic	1	-	1 (100%)	-	-
c.217C>A	p.Arg73=	Likely Pathogenic	1	1 (100%)	-	-	-
c.228_231delTGAC	p.Asp77GlnfsTer	Pathogenic	1	1 (100%)	-	-	-
c.272G>A	p.Arg91Lys	Uncertain Significance	1	1 (100%)	-	-	-
c.292C>G	p.Gln98Glu	Uncertain Significance	1	-	-	-	1 (100%)
c.315C>G	p.Tyr105Ter	Pathogenic	1	-	1 (100%)	-	-
c.430-2A>G	/	Pathogenic	1	1 (100%)	-	-	-
c.455_457delCCC	p.Pro152del	Likely Pathogenic	1	-	-	-	1 (100%)
c.467G>A	p.Gly156Asp	Likely Pathogenic	1	-	-	1 (100%)	-
c.468_469delICT	p.Trp157ValfsTer	Pathogenic	1	1 (100%)	-	-	-
c.468_470delICTG	p.Trp157del	Likely Pathogenic	1	1 (100%)	-	-	-
c.500delIC	p.Pro167GlnfsTer	Pathogenic	1	1 (100%)	-	-	-
c.515C>G	p.Pro172Arg	Uncertain Significance	1	1 (100%)	-	-	-
c.566G>A	p.Arg189His	Likely Pathogenic	1	1 (100%)	-	-	-
c.600G>A	p.Trp200Ter	Pathogenic	1	1 (100%)	-	-	-
c.619dupG	p.Asp207GlyfsTer	Pathogenic	1	1 (100%)	-	-	-

c.626dupT	p.Thr210AspfsTer	Pathogenic	1	-	1 (100%)	-	-
c.800G>A	p.Arg267Gln	Uncertain Significance	1	1 (100%)	-	-	-
No variant found*	/		5	4 (80%)	1 (20%)	-	-

Note: ACMG: American College of Medical Genetics; N: nombre de variant dans la population total in the whole population; n: nombre de variant dans le sous groupe d'âge

* En cas d'absence de variants identifiées, le patient est hétérozygote composite avec un second variant pathologique non connu.

Table 9. Description des 1900 variants du gènes *MMUT* selon les catégories d'âge, parmi les 269 patients diagnostiqués avec une acidurie méthylmalonique de type *MUT*.

Variant c.	Variant p.	Classification ACMG	Nombre d'occurrence de l'allèle – N	Age, 0 à 1 an – n (%)	Age, 1 à 14 ans – n (%)	Age, 15 ans et plus – n (%)	Absence de donnée sur l'âge – n (%)
c.572C>A	p.Ala191Glu	Pathogenic	27	17 (63%)	-	-	10 (37%)
c.655A>T	p.Asn219Tyr	Pathogenic	21	13 (62%)	1 (5%)	-	7 (33%)
c.1843C>A	p.Pro615Thr	Likely Pathogenic	18	18 (100%)	-	-	-
c.729_730insTT	p.Asp244LeufsTer	Uncertain Significance	15	9 (60%)	3 (20%)	2 (13%)	1 (7%)
c.682C>T	p.Arg228Ter	Likely Pathogenic	14	12 (86%)	-	-	2 (14%)
c.1106G>A	p.Arg369His	Pathogenic	11	9 (82%)	2 (18%)	-	-
c.1531C>T	p.Arg511Ter	Pathogenic	11	7 (64%)	1 (9%)	-	3 (27%)
c.2125-3C>G	/	Likely Pathogenic	10	2 (20%)	4 (40%)	-	4 (40%)
c.2179C>T	p.Arg727Ter	Pathogenic	10	10 (100%)	-	-	-
c.671_678dupAATT TATG	p.Val227AsnfsTer	Pathogenic	10	10 (100%)	-	-	-
c.2080C>T	p.Arg694Trp	Pathogenic	8	6 (75%)	1 (13%)	-	1 (13%)
c.1595G>A	p.Arg532His	Benign	7	6 (86%)	1 (14%)	-	-
c.1943G>A	p.Gly648Asp	Likely Pathogenic	7	1 (14%)	-	4 (57%)	2 (29%)
c.322C>T	p.Arg108Cys	Pathogenic	7	5 (71%)	-	-	2 (29%)
c.323G>A	p.Arg108His	Pathogenic	7	6 (86%)	1 (14%)	-	-
c.1025C>A	p.Ser342Ter	Pathogenic	6	3 (50%)	-	-	3 (50%)
c.1399C>T	p.Arg467Ter	Pathogenic	6	6 (100%)	-	-	-

c.1630_1631delGGInsTA	p.Gly544Ter	Pathogenic	6	4 (67%)	-	-	2 (33%)
c.454C>T	p.Arg152Ter	Pathogenic	6	6 (100%)	-	-	-
c.983T>A	p.Leu328Pro	Likely Pathogenic	6	6 (100%)	-	-	-
c.1038_1040delTCT	p.Leu347del	Likely Pathogenic	5	5 (100%)	-	-	-
c.1420C>T	p.Arg474Ter	Pathogenic	5	4 (80%)	-	-	1 (20%)
c.1808G>A	p.Arg603Lys	Likely Pathogenic	5	4 (80%)	-	-	1 (20%)
c.1867G>A	p.Gly623Arg	Pathogenic	5	3 (60%)	-	-	2 (40%)
c.278G>A	p.Arg93His	Pathogenic	5	4 (80%)	-	-	1 (20%)
c.607G>A	p.Asp203Asn	Pathogenic	5	3 (60%)	-	-	2 (40%)
c.1280G>A	p.Gly427Asp	Pathogenic	4	3 (75%)	-	1 (25%)	-
c.1741C>T	p.Arg581Ter	Pathogenic	4	4 (100%)	-	-	-
c.1876_1888del	p.Gly626GlufsTer	Pathogenic	4	-	2 (50%)	-	2 (50%)
c.2197G>A	p.Val733Ile	Uncertain Significance	4	-	-	-	4 (100%)
c.418_419delCTInsTA	p.Leu140Ter	Pathogenic	4	4 (100%)	-	-	-
c.970G>A	p.Val324Ile	Pathogenic	4	4 (100%)	-	-	-
c.1105C>T	p.Arg369Cys	Pathogenic	3	2 (67%)	-	-	1 (33%)
c.1181T>C	p.Leu394Ser	Likely Pathogenic	3	-	-	-	3 (100%)
c.1482_1501del	p.Glu495SerfsTer	Pathogenic	3	3 (100%)	-	-	-
c.1671G>A	p.Arg557=	Uncertain Significance	3	2 (67%)	-	-	1 (33%)
c.1677-1G>A	/	Pathogenic	3	2 (67%)	1 (33%)	-	-
c.257C>T	p.Pro86Leu	Likely Pathogenic	3	3 (100%)	-	-	-
c.482G>T	p.Gly161Val	Likely Pathogenic	3	3 (100%)	-	-	-
c.759G>A	p.Met253Ile	Uncertain Significance	3	3 (100%)	-	-	-
c.91C>T	p.Arg31Ter	Likely Pathogenic	3	3 (100%)	-	-	-
c.925T>G	p.Trp309Gly	Pathogenic	3	3 (100%)	-	-	-

c.1011T>G	p.Phe337Leu	Likely Pathogenic	2	2 (7%)	-	-	-
c.1022_1023dupAC	p.Ser342ThrfsTer	Pathogenic	2	2 (100%)	-	-	-
c.1029delA	p.Lys343AsnfsTer	Pathogenic	2	2 (100%)	-	-	-
c.1031C>A	p.Ser344Tyr	Likely Pathogenic	2	-	-	-	2 (100%)
c.1112delC	p.Ala371GlufsTer	Pathogenic	2	2 (100%)	-	-	-
c.1126G>T	p.Ala376Ser	Likely Pathogenic	2	2 (100%)	-	-	-
c.1149G>C	p.Gln383His	Pathogenic	2	-	1 (50%)	-	1 (50%)
c.1160C>T	p.Thr387Ile	Likely Pathogenic	2	-	-	-	2 (100%)
c.1361G>A	p.Gly454Glu	Likely Pathogenic	2	2 (100%)	-	-	-
c.1514T>C	p.Ile505Thr	Likely Pathogenic	2	2 (100%)	-	-	-
c.1540C>A	p.Gln514Lys	Likely Pathogenic	2	2 (100%)	-	-	-
c.15G>A	p.Lys5=	Likely Benign	2	2 (100%)	-	-	-
c.16_18delAATinsTAA	p.Asn6Ter	Likely Pathogenic	2	2 (100%)	-	-	-
c.160A>T	p.Lys54Ter	Pathogenic	2	2 (100%)	-	-	-
c.1615G>T	p.Glu539Ter	Likely Pathogenic	2	2 (100%)	-	-	-
c.1640A>C	p.Asn547Thr	Uncertain Significance	2	2 (100%)	-	-	-
c.165C>A	p.Asn55Lys	Uncertain Significance	2	2 (100%)	-	-	-
c.1660G>T	p.Asp554Tyr	Uncertain Significance	2	-	2 (100%)	-	-
c.1672G>A	p.Ala558Thr	Uncertain Significance	2	2 (100%)	-	-	-
c.167C>T	p.Pro56Leu	Uncertain Significance	2	2 (100%)	-	-	-
c.1790T>G	p.Ile597Arg	Uncertain Significance	2	-	2 (100%)	-	-
c.1825_1826insT	p.Glu609ValfsTer	Pathogenic	2	2 (100%)	-	-	-
c.1825G>T	p.Glu609Ter	Pathogenic	2	2 (100%)	-	-	-
c.1844C>T	p.Pro615Leu	Likely Pathogenic	2	2 (100%)	-	-	-
c.1846C>T	p.Arg616Cys	Likely Pathogenic	2	2 (100%)	-	-	-
c.1850T>G	p.Leu617Arg	Likely Pathogenic	2	2 (100%)	-	-	-

c.1874A>T	p.D625V	Pathogenic	2	2 (100%)	-	-	-
c.1880A>G	p.His627Arg	Pathogenic	2	2 (100%)	-	-	-
c.1924G>C	p.Gly642Arg	Likely Pathogenic	2	1 (50%)	-	-	1 (50%)
c.1940T>C	p.Ile647Thr	Likely Pathogenic	2	2 (100%)	-	-	-
c.1957-2A>G	/	Pathogenic	2	2 (100%)	-	-	-
c.1957delA	p.Thr653LeufsTer	Pathogenic	2	2 (100%)	-	-	-
c.1960_1962delCCT insTAA	p.Pro654Ter	Pathogenic	2	2 (100%)	-	-	-
c.1980G>C	p.Gln660His	Likely Pathogenic	2	1 (50%)	1 (50%)	-	-
c.2002G>C	p.Ala668Pro	Likely Pathogenic	2	-	2 (100%)	-	-
c.2020C>T	p.Leu674Phe	Likely Pathogenic	2	2 (100%)	-	-	-
c.2037A>C	p.Lys679Asn	Likely Pathogenic	2	2 (100%)	-	-	-
c.2087A>G	p.Asp696Gly	Likely Pathogenic	2	1 (50%)	-	-	1 (50%)
c.2099T>A	p.Met700Lys	Likely Pathogenic	2	1 (50%)	-	-	1 (50%)
c.2106delA	p.Val704Ter	Pathogenic	2	-	2 (100%)	-	-
c.2116C>A	p.Pro706Thr	Likely Pathogenic	2	2 (100%)	-	-	-
c.2124+1G>A	/	Pathogenic	2	2 (100%)	-	-	-
c.2128_2129insCTC	p.Tyr710delinsSerHis	Likely Pathogenic	2	2 (100%)	-	-	-
c.2130T>G	p.Tyr710Ter	Pathogenic	2	2 (100%)	-	-	-
c.2191G>A	p.Ala731Thr	Likely Pathogenic	2	2 (100%)	-	-	-
c.281G>T	p.Gly94Val	Pathogenic	2	2 (100%)	-	-	-
c.326A>G	p.Gln109Arg	Likely Pathogenic	2	2 (100%)	-	-	-
c.357C>A	p.Ser119Arg	Likely Pathogenic	2	-	-	-	2 (100%)
c.360dupT	p.Lys121Ter	Pathogenic	2	-	-	-	2 (100%)
c.385+46delC	/	Uncertain Significance	2	2 (100%)	-	-	-
c.394C>T	p.Gln132Ter	Pathogenic	2	2 (100%)	-	-	-
c.410C>G	p.Ala137Gly	Likely Pathogenic	2	-	2 (100%)	-	-

c.419T>C	p.Leu140Pro	Likely Pathogenic	2	2 (100%)	-	-	-
c.421G>A	p.Ala141Thr	Likely Pathogenic	2	-	2 (100%)	-	-
c.424A>G	p.Thr142Ala	Pathogenic	2	2 (100%)	-	-	-
c.433C>T	p.Arg145Ter	Likely Pathogenic	2	2 (100%)	-	-	-
c.436dupT	p.Tyr146LeufsTer	Pathogenic	2	2 (100%)	-	-	-
c.473G>T	p.Gly158Val	Likely Pathogenic	2	2 (100%)	-	-	-
c.497delC	p.Thr166MetfsTer	Pathogenic	2	2 (100%)	-	-	-
c.581C>T	p.Pro194Leu	Likely Pathogenic	2	2 (100%)	-	-	-
c.599T>C	p.Ile200Thr	Likely Pathogenic	2	-	-	-	2 (100%)
c.643G>A	p.Gly215Ser	Pathogenic	2	-	-	-	2 (100%)
c.662delT	p.Ile221AsnfsTer	Pathogenic	2	-	-	-	2 (100%)
c.689C>T	p.Thr230Ile	Pathogenic	2	-	-	-	2 (100%)
c.694dupA	p.Ile232AsnfsTer	Pathogenic	2	-	-	-	2 (100%)
c.770dupA	p.Asn257LysfsTer	Uncertain Significance	2	2 (100%)	-	-	-
c.810_811dupGG	p.Ala271GlyfsTer	Likely Pathogenic	2	-	2 (100%)	-	-
c.914T>C	p.Leu305Ser	Pathogenic	2	2 (100%)	-	-	-
c.103C>T	p.Gln35Ter	Pathogenic	1	1 (100%)	-	-	-
c.1046_1058delCACACTGTCAGAC	p.Ala349AspfsTer	Pathogenic	1	1 (100%)	-	-	-
c.1048delC	p.His350ThrfsTer	Pathogenic	1	1 (100%)	-	-	-
c.1054C>T	p.Gln352Ter	Pathogenic	1	-	-	-	1 (100%)
c.1061C>T	p.Ser354Phe	Likely Pathogenic	1	1 (100%)	-	-	-
c.1073T>C	p.Leu358Pro	Likely Pathogenic	1	1 (100%)	-	-	-
c.1233_1235delCAT	p.Ile412del	Uncertain Significance	1	1 (100%)	-	-	-
c.1237C>T	p.Gln413Ter	Pathogenic	1	1 (100%)	-	-	-
c.1240G>T	p.Glu414Ter	Pathogenic	1	1 (100%)	-	-	-
c.1283C>T	p.Ser428Phe	Likely Pathogenic	1	1 (100%)	-	-	-

c.1295A>C	p.Glu432Ala	Likely Pathogenic	1	-	1 (100%)	-	-
c.1333-8delC	/	Uncertain Significance	1	-	-	1 (100%)	-
c.1426C>T	p.Gln476Ter	Pathogenic	1	-	1 (100%)	-	-
c.1475A>T	p.Tyr492Phe	Uncertain Significance	1	1 (100%)	-	-	-
c.1481T>A	p.Leu494Ter	Pathogenic	1	-	1 (100%)	-	-
c.1495G>A	p.Ala499Thr	Benign	1	1 (100%)	-	-	-
c.1540C>G	p.Gln514Glu	Likely Pathogenic	1	1 (100%)	-	-	-
c.1571G>A	p.Ser524Asn	Uncertain Significance	1	-	-	-	1 (100%)
c.1630G>T	p.Gly544Ter	Pathogenic	1	1 (100%)	-	-	-
c.1642delA	p.Ile548SerfsTer	Pathogenic	1	-	1 (100%)	-	-
c.1646T>C	p.Leu549Pro	Likely Pathogenic	1	1 (100%)	-	-	-
c.1655delC	p.Ala552GlufsTer	Pathogenic	1	-	1 (100%)	-	-
c.1658T>G	p.Val553Gly	Uncertain Significance	1	1 (100%)	-	-	-
c.1675_1676delAGinsCC	p.Arg559Pro	Uncertain Significance	1	-	1 (100%)	-	-
c.1690G>T	p.Glu564Ter	Pathogenic	1	1 (100%)	-	-	-
c.1777G>T	p.Glu593Ter	Pathogenic	1	1 (100%)	-	-	-
c.1889G>A	p.Gly630Glu	Pathogenic	1	1 (100%)	-	-	-
c.1891G>A	p.Ala631Thr	Likely Pathogenic	1	1 (100%)	-	-	-
c.1919C>A	p.Asp640Ala	Likely Pathogenic	1	1 (100%)	-	-	-
c.1922T>C	p.Leu641Pro	Likely Pathogenic	1	1 (100%)	-	-	-
c.1968A>C	p.Glu656Asp	Likely Pathogenic	1	-	1 (100%)	-	-
c.1970T>A	p.Val657Glu	Likely Pathogenic	1	1 (100%)	-	-	-
c.1974C>G	p.Ala658=	Likely Benign	1	-	1 (100%)	-	-
c.2011_2012delATinsTA	p.Ile671Ter	Pathogenic	1	-	1 (100%)	-	-

c.2011A>G	p.Ile671Val	Benign	1	1 (100%)	-	-	-
c.2014delA	p.Ser672AlafsTer	Pathogenic	1	1 (100%)	-	-	-
c.2053dupC	p.Leu685ProfsTer	Pathogenic	1	1 (100%)	-	-	-
c.205A>G	p.Ile69Val	Uncertain Significance	1	1 (100%)	-	-	-
c.2062_2063insGA	p.Glu688GlyfsTer	Pathogenic	1	-	1 (100%)	-	-
c.2062G>T	p.Glu688Ter	Pathogenic	1	1 (100%)	-	-	-
c.2086G>T	p.Asp696Tyr	Likely Pathogenic	1	1 (100%)	-	-	-
c.2107G>A	p.Gly703Arg	Pathogenic	1	-	1 (100%)	-	-
c.2159_2160delAT	p.Asn720SerfsTer	Likely Pathogenic	1	1 (100%)	-	-	-
c.2200C>T	p.Gln734Ter	Pathogenic	1	-	-	-	1 (100%)
c.2216T>C	p.Ile739Thr	Likely Pathogenic	1	-	1 (100%)	-	-
c.2218G>A	p.Glu740Lys	Likely Pathogenic	1	1 (100%)	-	-	-
c.349G>T	p.Glu117Ter	Pathogenic	1	1 (100%)	-	-	-
c.377dupA	p.Asn126LysfsTer	Pathogenic	1	-	1 (100%)	-	-
c.383_384delAGins TA	p.Lys128Ile	Uncertain Significance	1	-	1 (100%)	-	-
c.385+9T>C	/	Uncertain Significance	1	-	-	-	1 (100%)
c.39delT	p.His14IlefsTer	Likely Pathogenic	1	-	1 (100%)	-	-
c.410C>T	p.Ala137Val	Likely Pathogenic	1	1 (100%)	-	-	-
c.433G>A	p.Gly145Ser	Pathogenic	1	1 (100%)	-	-	-
c.441T>A	p.Asp147Glu	Likely Pathogenic	1	1 (100%)	-	-	-
c.481G>A	p.Gly161Arg	Pathogenic	1	1 (100%)	-	-	-
c.482G>A	p.Arg161Gln	Likely Pathogenic	1	1 (100%)	-	-	-
c.484G>T	p.Val162Phe	Likely Pathogenic	1	-	-	-	1 (100%)
c.494A>G	p.Asp165Gly	Likely Pathogenic	1	1 (100%)	-	-	-
c.554C>T	p.Ser185Phe	Likely Pathogenic	1	1 (100%)	-	-	-
c.567T>G	p.Asn189Lys	Pathogenic	1	1 (100%)	-	-	-

c.623delT	p.Val208AspfsTer	Pathogenic	1	1 (100%)	-	-	-
c.626dupC	p.Lys210Ter	Pathogenic	1	1 (100%)	-	-	-
c.643G>T	p.Gly215Cys	Pathogenic	1	-	-	-	1 (100%)
c.648C>A	p.Thr216=	Likely Benign	1	-	1 (100%)	-	-
c.655A>G	p.Asn219Asp	Likely Pathogenic	1	-	1 (100%)	-	-
c.655A>G	p.Asn219Asp	Pathogenic	1	1 (100%)	-	-	-
c.683G>A	p.Arg228Gln	Likely Pathogenic	1	-	-	-	1 (100%)
c.68C>G	p.Ser23Ter	Pathogenic	1	1 (100%)	-	-	-
c.699delT	p.Pro234LeufsTer	Pathogenic	1	1 (100%)	-	-	-
c.731A>T	p.Asp244Val	Pathogenic	1	-	-	-	1 (100%)
c.753_753+1insT	p.His252SerfsTer	Pathogenic	1	1 (100%)	-	-	-
c.754-1G>A	/	Pathogenic	1	1 (100%)	-	-	-
c.755dupA	p.His252GlnfsTer	Uncertain Significance	1	1 (100%)	-	-	-
c.765A>T	p.Lys255Asn	Pathogenic	1	-	-	-	1 (100%)
c.788G>T	p.Gly263Val	Pathogenic	1	1 (100%)	-	-	-
c.7delA	p.Arg3GluTer	Pathogenic	1	-	-	-	1 (100%)
c.809_812dupGGG C	p.Asp272GlyfsTer	Pathogenic	1	1 (100%)	-	-	-
c.862T>C	p.Ser288Pro	Likely Pathogenic	1	1 (100%)	-	-	-
c.972delT	p.Gly325ValfsTer	Pathogenic	1	1 (100%)	-	-	-
c.982C>T	p.Leu328Phe	Likely Pathogenic	1	-	-	-	1 (100%)
No variant found*	/		23	16 (70%)	4 (17%)	-	3 (13%)

* En cas d'absence de variants identifiés, le patient est hétérozygote composite avec un second variant pathologique non connu.

Table 10. Description des 31 variants du gène *MMAA* selon les catégories d'âge, parmi les 50 patients diagnostiqués avec une acidurie méthylmalonique de type *cbIA*.

Variant c.	Variant p.	Classification ACMG	Nombre d'occurrence de l'allèle – N	Age, 0 à 1 an – n (%)	Age, 1 à 14 ans – n (%)	Age, 15 ans et plus – n (%)	Absence de donnée sur l'âge – n (%)
c.433C>T	p.Arg145Ter	Pathogenic	20	16 (80%)	2 (10%)	-	2 (10%)
c.586C>T	p.Arg196X	Pathogenic	6	1 (17%)	2 (33%)	2 (33%)	1 (17%)
c.397C>T	p.Gln133Ter	Pathogenic	5	5 (100%)	-	-	-
c.593_596delCTGA	p.Thr198SerfsTer6	Pathogenic	5	2 (40%)	2 (40%)	-	1 (20%)
c.64C>T	p.Arg22X	Pathogenic	5	3 (60%)	-	-	2 (40%)
c.594dupT	p.Glu199Ter	Pathogenic	4	4 (100%)	-	-	-
c.662_664delCAA	p.Thr221del	Likely Pathogenic	4	2 (50%)	-	-	2 (50%)
c.828A>T	p.Lys276Asn	Likely Pathogenic	4	2 (50%)	-	-	2 (50%)
delexon2-3-4	/	NR	4	-	-	-	4 (100%)
c.674delA	p.Asn225MetfsTer	Pathogenic	3	2 (67%)	-	-	1 (33%)
c.733G>A	p.Gly245Ser	Likely Pathogenic	3	2 (67%)	-	-	1 (33%)
c.220C>T	p.His74Tyr	Uncertain Significance	2	2 (100%)	-	-	-
c.292A>G	p.Arg98Gly	Likely Pathogenic	2	2 (100%)	-	-	-
c.329C>G	p.Ser110Ter	Pathogenic	2	2 (100%)	-	-	-
c.358C>T	p.Gln120Ter	Pathogenic	2	2 (100%)	-	-	-
c.365A>T	p.His122Leu	Uncertain Significance	2	-	2 (100%)	-	-
c.365T>C	p.Leu122Pro	Uncertain Significance	2	-	2 (100%)	-	-
c.450dupG	p.Pro151AlafsTer	Pathogenic	2	2 (100%)	-	-	-
c.556A>T	p.Ser186Cys	Uncertain Significance	2	2 (100%)	-	-	-
c.562+1_562+2insT	/	Uncertain Significance	2	2 (100%)	-	-	-

c.562G>C	p.Gly188Arg	Likely Pathogenic	2	2 (100%)	-	-	-
<u>c.72C>A</u>	p.Tyr24Ter	Pathogenic	2	-	2 (100%)	-	-
c.812_813dupAG	p.Leu272SerfsTer	Pathogenic	2	2 (100%)	-	-	-
c.19C>T	p.His7Tyr	Uncertain Significance	1	1 (100%)	-	-	-
c.445_448delTCTG	p.Ser149GlyfsTer	Pathogenic	1	-	-	-	1 (100%)
c.450_451InsG	p.Pro151AlafsTer	Pathogenic	1	1 (100%)	-	-	-
c.594_598del	p.Glu199IlefsTer	Likely Pathogenic	1	-	-	-	1 (100%)
c.607G>A	p.Asp203Asn	Likely Pathogenic	1	-	1 (100%)	-	-
c.655G>T	p.Gly219Cys	Likely Pathogenic	1	-	1 (100%)	-	-
c.691T>A	p.Cys231Ser	Uncertain Significance	1	1 (100%)	-	-	-
c.970G>A	p.Val324Ile	Uncertain Significance	1	-	1 (100%)	-	-
No variant found*	/		2	2 (100%)	-	-	-

* En cas d'absence de variants identifiés, le patient est hétérozygote composite avec un second variant pathologique non connu.

Table 11. Description des 20 variants du gène *MMAB* selon les catégories d'âge, parmi les 29 patients diagnostiqués avec une acidurie méthylmalonique de type *cbIB*.

Variant c.	Variant p.	Classification ACMG	Nombre d'occurrence de l'allèle – N	Age, 0 à 1 an – n (%)	Age, 1 à 14 ans – n (%)	Age, 15 ans et plus – n (%)	Absence de donnée sur l'âge – n (%)
c.571C>T	p.Arg191Trp	Pathogenic	9	9 (100%)	-	-	-
c.454G>T	p.Glu152Ter	Pathogenic	8	8 (100%)	-	-	-
c.291-1G>A	/	Pathogenic	6	4 (67%)	-	-	2 (33%)
c.287T>C	p.Ile96Thr	Likely Pathogenic	5	4 (80%)	1 (20%)	-	-
c.682delG	p.Ala228ProfsTer	Likely Pathogenic	4	4 (100%)	-	-	-
c.563_577dup	p.Val188_Ala192dup	Pathogenic	3	3 (100%)	-	-	-
c.572G>A	p.Arg191Gln	Pathogenic	3	3 (100%)	-	-	-
c.23delG	p.Ser8ThrfsTer	Likely Pathogenic	2	2 (100%)	-	-	-
c.334G>T	p.Glu112Ter	Pathogenic	2	2 (100%)	-	-	-
c.548A>T	p.His183Leu	Likely Pathogenic	2	1 (50%)	-	-	1 (50%)
c.568_570dup	p.Arg191dup	Likely Pathogenic	2	1 (50%)	-	-	1 (50%)
c.584G>A	p.Arg195His	Pathogenic	2	1 (50%)	1 (50%)	-	-
c.585-1G>A	/	Pathogenic	2	2 (100%)	-	-	-
c.227_236delGACCCAAAGA	p.Arg76MetfsTer	Likely Pathogenic	1	1 (100%)	-	-	-
c.290G>A	p.Gly97Glu	Likely Pathogenic	1	1 (100%)	-	-	-
c.349-1G>C	/	Pathogenic	1	1 (100%)	-	-	-
c.398C>T	p.Ser133Phe	Uncertain Significance	1	1 (100%)	-	-	-
c.435delC	p.Phe145LeufsTer	Likely Pathogenic	1	1 (100%)	-	-	-
c.556C>T	p.Arg186Trp	Pathogenic	1	-	-	-	1 (100%)

c.568C>T	p.Arg190Cys	Pathogenic	1	-	-	-	1 (100%)
c.571C>T	p.Arg191Trp	Pathogenic	9	9 (100%)	-	-	-
No variant found*	/		1	1 (100%)	-	-	-

* En cas d'absence de variants identifiés, le patient est hétérozygote composite avec un second variant pathologique non connu

2.3.3 Description phénotypique des maladies héréditaires du métabolisme de la vitamine B₁₂ et marqueurs prédictifs associés.

Le pourcentage de patients décrits ayant moins de 1 an lors des premières manifestations est de 71,1% (509/824). Parmi eux, les mutations sur *MMACHC* représentent 44,4% des cas (226/509). Pour le gène *MMUT*, cela représente 37,7% (192/509) des cas. Dans ce groupe d'âge, les manifestations neurologiques sont les plus fréquemment observées, regroupant le retard de développement (40,5% ; 206/509), l'hypotonie (21,0% ; 107/509) et les convulsions (9,4% ; 48/509). Les difficultés alimentaires sont rapportées chez 30,6% des patients (156/509). Le décès est rapporté dans 17,1% des cas (87/509) (**Table 12**)

Les patients dont les premières manifestations cliniques apparaissent entre 1 et 14 ans sont au nombre de 133 (âge médian : 4,0 ans, IQR 2,0–9,0). Dans cette catégorie d'âge, une mutation du gène *MMACHC* est rapportée dans 57,1% des cas (76/133), une mutation du gène *MMUT* dans 20,3% des cas (27/133). Les manifestations neurologiques sont également les plus fréquentes, en premier lieu desquelles on retrouve le retard de développement (39,1%, 52/133) et les neuropathies périphériques (15,8%, 21/133). Les manifestations cardio-vasculaires sont relativement fréquentes : l'hypertension artérielle et l'hypertension artérielle pulmonaire concernent 8,3% des cas (11/133) et les cardiomyopathies 5,3% (7/133).

Soixante-quatorze individus ont plus de 15 ans au moment des premiers signes, (âge médian 20,0 ans, IQR 18,0–29,0). Dans cette catégorie d'âge, une mutation du gène *MMACHC* est rapportée dans 91,9% des cas (68/74). Les manifestations neurologiques sont les plus souvent rapportées, avec en premier lieu des difficultés à la marche dans 37,8% (28/74), un retard du développement dans 32,4% (24/74) et une neuropathie périphérique dans 29,7% (22/74). Les troubles psychiatriques et l'hypertension artérielle ont été rapportés dans 33,8% (25/74) et 12,2% (9/74) des cas respectivement.

Nous avons évalué l'effet de l'âge sur les manifestations cliniques observées (**Figure 23**). Nous avons observé une augmentation significative des manifestations neurologiques selon les catégories d'âge, notamment en ce qui concerne la neuropathie périphérique, le syndrome pyramidal, et de façon moins marquée le syndrome extra-pyramidal. Nous avons également observé une influence significative de l'âge sur la fréquence d'observation de l'atrophie cérébrale, sur les anomalies

électrophysiologiques et sur les manifestations psychiatriques. Au contraire, les manifestations ophtalmologiques (nystagmus et strabisme) sont principalement rapportées durant la première année de vie. Les manifestations cardiovasculaires, incluant les thromboses et l'hypertension artérielle augmentent significativement avec l'âge. L'augmentation de la tension artérielle n'est pas associée à la survenue d'une insuffisance rénale, celle-ci n'étant pas significativement associée à l'âge (**Figure 23**).

Table 12. Manifestations cliniques, biologiques et résultats d'imageries et d'électrophysiologies rapportées chez les 824 patients inclus selon les catégories d'âge.

	Patients de moins d'un an	Patients entre 1 and 14 ans	Patients de plus de 15 ans
Données démographiques			
Age (ans) – n; médiane (IQR)	509; 0.0 (0.0–0.3)	133; 4.0 (2.0–9.0)	74; 20.0 (18.0–29.0)
Masculin – n/N; % (95% CI)	212/383; 55.4 (50.4–60.4)	52/119; 43.7 (34.7–52.7)	32/65; 49.2 (36.7–61.7)
Gènes – n/N; % (95% CI)			
<i>MMACHC</i>	226/509; 44.4 (40.1–48.7)	76/133; 57.1 (48.6–65.7)	68/74; 91.9 (85.5–98.3)
<i>MMUT</i>	192/509; 37.7 (33.5–41.9)	27/133; 20.3 (13.4–27.2)	4/74; 5.4 (1.3–10.7)
<i>MMAA</i>	31/509; 6.1 (4.0–8.2)	8/133; 6.0 (1.9–10.1)	1/74; 1.4 (0.0–4.0)
<i>MMAB</i>	25/509; 4.0 (3.0–6.8)	1/133; 0.8 (0.0–2.2)	0/74; 0.0 (0.0–0.0)
<i>TCN2</i>	12/509; 2.4 (1.0–3.7)	1/133; 0.8 (0.0–2.2)	0/74; 0.0 (0.0–0.0)
<i>MMADHC</i>	10/509; 2.0 (7.6–3.2)	4/133; 3.0 (0.0–0.6)	0/74; 0.0 (0.0–0.0)
<i>MTRR</i>	4/509; 0.8 (0.0–1.6)	3/133; 2.3 (0.0–4.8)	1/74; 1.4 (0.0–4.0)
<i>MTR</i>	3/509; 0.6 (0.0–1.3)	0/133; 0.0 (0.0–0.0)	0/74; 0.0 (0.0–0.0)
<i>ABCD4</i>	2/509; 0.4 (0.0–0.1)	2/133; 1.5 (0.0–3.6)	0/74; 0.0 (0.0–0.0)
<i>LMRD1</i>	2/509; 0.4 (0.0–0.1)	0/133; 0.0 (0.0–0.0)	0/74; 0.0 (0.0–0.0)
<i>CD320</i>	1/509; 0.2 (0.0–0.0)	0/133; 0.0 (0.0–0.0)	0/74; 0.0 (0.0–0.0)
<i>ZF143</i>	1/509; 0.2 (0.0–0.0)	0/133; 0.0 (0.0–0.0)	0/74; 0.0 (0.0–0.0)
<i>AMN</i>	0/509; 0.0 (0.0–0.0)	6/133; 4.5 (0.9–8.1)	0/74; 0.0 (0.0–0.0)
<i>CBLIF</i> (alias, <i>GIF</i>)	0/509; 0.0 (0.0–0.0)	3/133; 2.3 (0.0–4.8)	0/74; 0.0 (0.0–0.0)
<i>CUBN</i>	0/509; 0.0 (0.0–0.0)	2/133; 1.5 (0.0–3.6)	0/74; 0.0 (0.0–0.0)
Clusters de gènes* – n/N; % (95% CI)			
Mitochondrie‡	251/508; 49.4 (45.0–53.8)	37/133; 27.8 (20.1–35.5)	5/74; 6.8 (0.9–12.6)
Transport cytoplasmique§	232/508; 45.7 (41.3–50.0)	77/133; 57.9 (49.4–66.4)	68/74; 91.9 (85.5–98.3)
Biodisponibilité B ₁₂ †	17/508; 3.4 (1.8–4.9)	14/133; 10.5 (5.2–15.8)	0/74; 0.0 (0.0–0.0)
Reméthylation	8/508; 1.6 (0.5–2.7)	5/133; 3.8 (0.5–7.1)	1/74; 1.4 (0.0–4.0)

Signes cliniques			
Manifestations neurologiques – n/N; % (95% CI)			
Retard de développement	40.5; (36.2–44.7)	52/133; 39.1 (30.7–47.5)	24/74; 32.4 (21.5–43.4)
Hypotonie	107/509; 21.0 (17.5–24.6)	16/133; 12.0 (6.4–1.8)	0/74; 0.0 (0.0–0.0)
Convulsions	48/509; 9.4 (6.9–12.0)	20/133; 15.0 (8.9–21.2)	11/74; 14.9 (6.6–23.2)
Microcephalie	21/509; 4.1 (2.4–5.9)	1/133; 0.8 (0.0–2.2)	0/74; 0.0 (0.0–0.0)
Troubles de la marche	16/509; 3.1 (1.6–4.7)	20/133; 15.0 (8.9–21.2)	28/74; 37.8 (26.5–49.2)
Neuropathie périphérique	16/509; 3.1 (1.6–4.7)	21/133; 15.8 (9.6–22.1)	22/74; 29.7 (19.1–40.4)
Syndrome extrapyramidal	14/509; 2.8 (1.3–4.2)	6/133; 4.5 (0.9–8.1)	8/74; 10.8 (3.6–18.1)
Syndrome pyramidal	10/509; 2.0 (0.9–3.2)	6/133; 4.5 (0.9–8.1)	19/74; 25.7 (15.5–35.9)
Manifestations digestives– n/N; % (95% CI)			
Intolérance alimentaire	156/509; 30.6 (26.6–34.7)	33/133; 24.8 (17.4–32.2)	3/74; 4.1 (0.0–8.7)
Défaillance d'organes – n/N; % (95% CI)			
Décès	87/509; 17.1 (13.8–20.4)	10/133; 7.5 (5.2–9.8)	4/74; 5.4 (1.3–10.7)
Accès métabolique aigu	82/509; 16.1 (12.9–19.3)	12/133; 9.0 (4.1–14.0)	4/74; 5.4 (1.3–10.7)
Manifestations ophtalmologiques – n/N; % (95% CI)			
Nystagmus	55/509; 10.8 (8.1–13.5)	6/133; 4.5 (0.9–8.1)	2/74; 2.7 (0.0–6.5)
Maculopathie ou rétinopathie	52/509; 10.2 (7.6–12.9)	5/133; 3.8 (0.5–7.0)	5/74; 6.8 (0.9–12.6)
Strabisme	23/509; 4.5 (2.7–6.3)	1/133; 0.8 (0.0–2.2)	0/74; 0.0 (0.0–0.0)
Manifestations rénales – n/N; % (95% CI)			
Maladies rénales chroniques	37/509; 7.3 (5.0–9.5)	12/133; 9.0 (4.1–14.0)	7/74; 9.5 (2.6–16.3)
Insuffisance rénale aiguë ou SHU	21/509; 4.1 (2.4–5.9)	14/133; 10.5 (5.3–15.8)	2/74; 2.7 (0.0–6.5)
Manifestations cardiovasculaires – n/N; % (95% CI)			
Cardiomyopathie	17/509; 3.3 (1.8–4.9)	7/133; 5.3 (1.4–9.1)	2/74; 2.7 (0.0–6.5)
Hypertension pulmonaire	4/509; 0.8 (0.0–1.6)	11/133; 8.3 (3.5–13.0)	1/74; 1.4 (0.0–4.0)
Thromboses	3/509; 0.6 (0.0–1.3)	5/133; 3.8 (0.5–7.0)	5/74; 6.8 (0.9–12.6)
Hypertension artérielle	2/509; 0.4 (0.0–0.9)	9/133; 6.8 (2.4–11.1)	9/74; 12.2 (4.5–19.8)
Manifestations psychiatriques – n/N; % (95% CI)			
Troubles du comportement	11/509; 2.2 (0.9–3.4)	8/133; 6.0 (1.9–10.1)	4/74; 5.4 (1.3–10.7)
Psychose	8/509; 1.6 (0.5–2.7)	18/133; 13.5 (7.6–19.4)	25/74; 33.8 (22.8–44.8)

Autres manifestations – n/N; % (95% CI)			
Retard de croissance intra-utérin	8/509; 1.6 (0.5–2.7)	3/133; 2.7 (0.0–4.8)	1/74; 1.4 (0.0–4.0)
Goutte	5/509; 1.0 (0.1–1.8)	0/133; 0.0 (0.0–0.0)	0/74; 0.0 (0.0–0.0)
Manifestations cutanées	1/509; 0.2 (0.0–0.6)	4/133; 3.0 (0.0–6.0)	1/74; 1.4 (0.0–4.0)
Grossesse	0/509; 0.0 (0.0–0.0)	2/133; 1.5 (0.0–3.6)	2/74; 2.7 (0.0–6.5)
Signes biologiques			
Hématologie			
Anémie – n/N; % (95% CI)	42/509; 8.3 (5.9–10.6)	47/133; 35.3 (27.1–43.6)	11/74; 14.9 (6.6–23.2)
Cytopénie – n/N; % (95% CI)	23/509; 4.5 (2.7–6.3)	18/133; 13.5 (7.6–19.4)	3/74; 4.1 (0.0–8.7)
Hb (g/dL) – n; médiane (IQR)	25; 7.3 (6.5–10.0)	36; 7.9 (7.0–10.3)	9; 8.9 (7.8–11.6)
GB (G/L) – n; médiane (IQR)	16; 4.995 (3.693–7.025)	13; 7.000 (4.900–10.200)	0; —
Plaquettes (G/L) – n; médiane (IQR)	15; 83 (21.5–263.5)	20; 199 (122–292.5)	2; 128.5 (82–175)
Biochimie, sang – n, médiane (IQR)			
Homocystéine (µmol/L)	137; 92 (50–157)	64; 90 (59–123)	60; 99 (67–117)
Méthionine (µmol/L)	77; 11 (7–14)	22; 19 (12–25)	15; 9 (8–16)
C3-Carnitine (µmol/L)	69; 10.4 (6.5–14.1)	17; 7.9 (7.1–11.2)	7; 11.2 (7.8–15.5)
MMA (µmol/L)	66; 20 (4–93)	9; 29 (6–14)	9; 22 (8–70)
Ammoniémie (µmol/L)	31; 198 (141–402)	3; 206 (113–232)	6; 32 (15–54)
B ₁₂ (pmol/L)	21; 362 (181–573)	22; 396 (112–611)	7; 428 (380–738)
Biochimie, urine – n, médiane (IQR)			
MMA (mM/mol créatine)	131; 1940 (550–4663)	44; 950 (173–2801)	22; 486 (244–1009)
Imagerie et explorations électrophysiologiques – n/N, % (95% CI)			
IRM cérébrale	61/509; 12.0 (9.2–14.8)	41/133; 30.8 (22.9–38.8)	35/74; 47.3 (35.7–58.9)
Anomalie de signal	39/61; 64.0 (51.9–76.0)	17/41; 41.5 (26.4–56.5)	9/35; 25.7 (11.2–40.2)
Sans particularité	20/61; 32.8 (21.0–44.6)	5/41; 12.2 (2.2–22.2)	7/35; 20.0 (6.7–33.2)
Atrophie cérébrale	8/61; 13.1 (4.6–21.6)	22/41; 53.7 (38.4–68.9)	21/35; 60.0 (43.8–76.2)
Anomalies EEG (hors crises) ¶	61/509; 12.0 (9.2–14.8)	6/133; 4.5 (0.9–8.1)	2/74; 2.7 (0.0–6.5)
Anomalies EMG	39/61; 64.0 (51.9–76.0)	7/133; 5.3 (1.4–9.1)	14/74; 18.9 (9.8–28.1)

Traitement – n/N, % (95% CI)			
Supplémentation en B ₁₂	156/509; 30.6 (26.6–34.7)	66/133; 49.6 (45.3–54.0)	56/74; 75.7 (65.7–85.7)
Transplantation rénale	13/509; 2.6 (1.2–3.9)	0/133; 0.0 (0.0–0.0)	1/74; 1.4 (0.0–4.0)
Transplantation hépatique	15/509; 3.0 (1.5–4.4)	0/133; 0.0 (0.0–0.0)	0/74; 0.0 (0.0–0.0)

Note. *MMACHC* : Metabolism of cobalamin associated C ; MMA : acide méthylmalonique ; SHU : syndrome hémolytique et urémique ; Hb : hémoglobine ; GB : Globules blancs ; IRM : imagerie par résonance magnétique ; EEG : électroencéphalogramme ; EMG : électromyogramme ; IQR : écart interquartile ; Ref : valeurs de référence.

* Un patient a deux mutations sur le gène *ZNF143* qui n'appartient à aucun groupe fonctionnel de gènes.

† Le cluster de gène « Biodisponibilité B₁₂ » regroupe tous les patients avec des variants sur les gènes *CBLIF* (alias, *GIF*), *CUBN*, *AMN*, *TCN2*, *LMBRD1*, *CD320*, ou *ABCD4*.

§ Le cluster de gène « Transport cytoplasmique » regroupe tous les patients avec des variants sur les gènes *MMACHC* ou *MMADHC* responsables d'une acidurie méthylmalonique avec hyperhomocystéinémie.

‡ Le cluster de gène « Mitochondrie » regroupe tous les patients avec des variants sur les gènes *MMAA*, *MMAB*, *MMUT* ou *MMADHC* responsables d'une acidurie méthylmalonique isolée.

|| Le cluster de gène « Reméthylation » regroupe tous les patients avec des variants sur les gènes *MTR*, *MTRR* ou *MMADHC* responsables d'une hyperhomocystéinémie isolée.

¶ Tracé EEG de fond pathologique hors évènement critique.

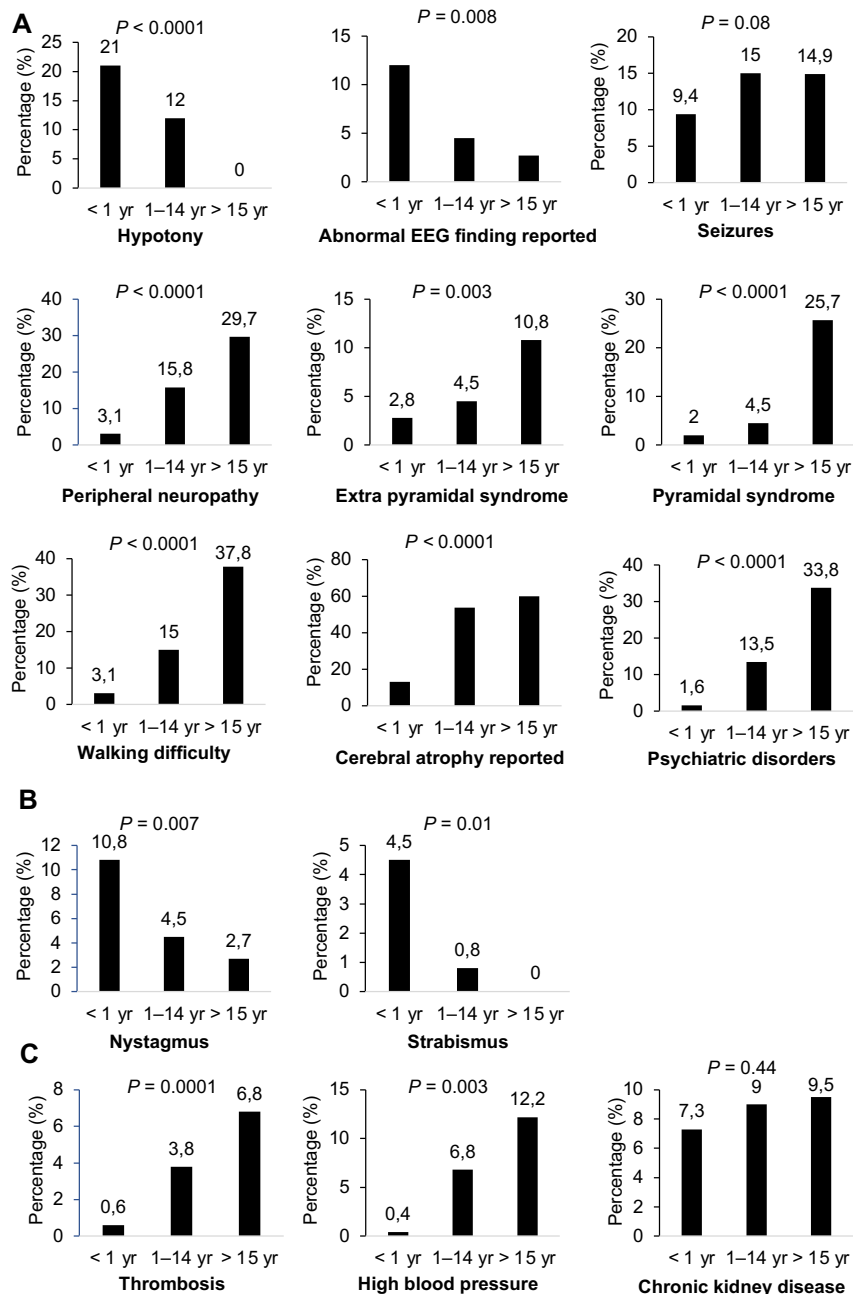


Figure 23. Influence de l'âge sur les manifestations rapportées, "0 à 1 an", "1 à 14 ans" et "plus de 15 ans".

(A) Les manifestations neuropsychiatriques comprennent l'hypotonie, les anomalies de tracé de fond sur l'EEG, les crises d'épilepsie, la neuropathie périphérique, le syndrome extrapyramidal, le syndrome pyramidal, les troubles de la marche et l'atrophie cérébrale rapportée par l'IRM.

(B) Les manifestations ophtalmologiques comprennent le nystagmus et le strabisme.

(C) Les manifestations cardiovasculaires et rénales comprennent la thrombose, l'hypertension artérielle et la maladie rénale chronique.

2.3.4 Phénotypes des troubles héréditaires du métabolisme de la vitamine B₁₂ selon les groupes fonctionnels de gènes et marqueurs prédictifs associés

2.3.4.1 Cluster de gènes « Transport cytoplasmique »

Nous avons recensé 416 patients dans ce groupe de gènes. L'âge médian des patients au début des symptômes est de 0,3 ans (IQR 0–10,3) (**Table 13**). 61,5% des patients ont moins de 1 an (232/377), 20,4% ont entre 1 et 14 ans inclus (77/377) et 18,0% (68/377) ont plus de 15 ans. Parmi les manifestations neurologiques les plus fréquemment rapportées, on note le retard de développement dans 35,3% (147/416), puis l'hypotonie dans 15,4% (64/416) et les convulsions dans 14,2% (59/416). Les manifestations ophtalmologiques sont fréquemment rapportées, incluant le nystagmus pour 16,8% des patients (70/416) ou la maculopathie et/ou rétinopathie pour 15,1% (63/416). Des troubles psychiatriques sont observés chez 11,8% des patients (49/416), la cardiomyopathie chez 5,1% des patients (21/416). Soixante-dix variants du gène *MMACHC* ont été rapportés (**Table 8**). Les variants les plus fréquemment observés sont le variant c.270_271dupA (274 cas, plus fréquemment observé dans le groupe d'âge « 0 à 1 an », 76% des cas soit 208/274), puis le variant c.609G>A (98 occurrences) et le variant c.482G>A (82 occurrences, plus fréquemment observé dans le groupe d'âge « 15 ans et plus », 46% des cas (38/82)).

L'analyse par régression logistique avec correction de Bonferroni a permis d'identifier les marqueurs suivants, classés par valeurs décroissantes d'odd ratio (OR), comme étant associés à une mutation d'un gène du cluster fonctionnel « Transport cytoplasmique » en comparaison aux autres clusters de gènes : Nystagmus (OR : 27,24 ; 95% CI : 8,50–87,30) ; maculopathie ou rétinopathie (OR : 17,98 ; 95% CI : 6,48–49,90); manifestations psychiatriques (OR : 17,98; 95% CI : 5,56–58,18) ; catégorie d'âge « 15 ans et plus » (OR : 12,18; 95% CI : 5,21–28,46) ; troubles du comportement (OR : 11,31 ; 95% CI : 2,64–48,41) ; hypertension artérielle (OR : 9,69 ; 95% CI : 2,24–41,88); anomalie à l'électromyogramme (OR : 6,80; 95% CI : 2,01–23,07); neuropathie périphérique (OR : 3,49 ; 95% CI : 1,92–6,33) ; convulsions (OR : 2,33; 95% CI : 1,44–3,75); et hyperhomocystéinémie (augmentation pour chaque palier de 10 µmol/L) (OR : 1,14 ; 95% CI : 1,07–1,22) (**Figure 24A**).

Par comparaison avec le cluster de gènes « Biodisponibilité B₁₂ » les éléments suivants sont significativement associés à une mutation d'un gène du cluster « Transport cytoplasmique » : Vitamine B₁₂ plasmatique (pour chaque palier de 100

pmol/L) (OR : 2,58 ; 95% CI : 1,44–4,63), et homocystéine (pour chaque palier de 10 µmol/L) (OR : 1,30 ; 95% CI : 1,14–1,49) (**Table 14**).

2.3.4.2 Cluster fonctionnel de gènes « Mitochondrie »

Nous avons recensé 353 patients dans le groupe fonctionnel « Mitochondrie ». L'âge médian est de 0,1 ans (IQR : 0,0–0,7). 85,7% des patients ont moins de 1 an (251/293), 12,6% ont entre 1 et 14 ans inclus (37/293) et 1,7% ont plus de 15 ans (5/293) (**Table 13**). Le retard de développement (40,2% ; 142/353) et l'hypotonie (21,2% 75/353) sont les manifestations les plus fréquemment rapportées. Les décompensations métaboliques sont rapportées dans 26,3% des cas. 27,5% des patients ont des manifestations digestives (97/353). Le décès est rapporté dans 21,0% des cas (74/353). De rares manifestations ophtalmologiques et cardiologiques sont rapportées. A l'IRM, une atrophie cérébrale n'est rapportée que dans 6,4% des cas (4/62), alors qu'une anomalie de signal est rapportée dans 58,0% des cas (36/62). Une transplantation hépatique a été réalisé dans 4,5% des cas (16/353).

190 variants du gène *MMUT* ont été rapportés. Le variant c.572C>A est le plus fréquemment observé (27 occurrences), puis le variant c.655A>T (21 occurrences) (**Table 9**). Le variant c.433C>T est le variant le plus fréquemment rapporté (27 fois) parmi les 31 variants du gène *MMAA* (**Table 10**). Pour le gène *MMAB*, les variants sont souvent associés avec une manifestation dans les premiers mois de vie (**Table 11**).

La régression logistique avec correction de Bonferroni a permis d'identifier différentes manifestations associées à une mutation d'un gène du cluster « Mitochondrie » comparé aux autres clusters de gènes. Ces éléments sont classés par OR décroissants, : la survenue d'une décompensation métabolique aiguë (OR : 10,15 ; 95% CI : 5,84–17,63) ; la catégorie d'âge "0 à 1 an" (OR : 3,83 ; 95% CI : 2,62–5,62) ; le décès (OR : 3,51 ; 95% CI : 2,27–5,44) ; une augmentation de C3-carnitine (OR : 1,24 ; 95% CI : 1,12–1,38) ; une augmentation du MMA urinaire (pour chaque palier de 500 mmol/mol créatinine) (OR : 1,17 ; 95% CI : 1,09–1,25) ; et une augmentation du MMA plasmatique (pour chaque palier de 10 µmol/L) (OR : 1,14 ; 95% CI : 1,07–1,23) (**Figure 24B** et **Table 14**).

Table 13. Manifestations cliniques, biologiques et résultats d'imageries et d'électrophysiologies rapportées chez les 824 patients inclus selon les clusters fonctionnels de gènes.

	Transport cytoplasmique †	Mitochondrie ‡	B₁₂ biodisponibilité 	Reméthylation§
Données démographiques				
Age (Ans) – n, médiane (IQR)	377; 0.3 (0.0–10.3)	293; 0.1 (0.0–0.7)	31; 0.3 (0.2–2.1)	14; 0.3 (0.1–5.0)
Age, 0 à 1 – n/N, % (95% CI)	232/377; 61.5 (56.6–66.5)	251/293; 85.7 (81.6–89.7)	17/31; 54.8 (36.3–73.4)	8/14; 57.1 (56.5–79.5)
Age, 1 à 14 ans inclus – n/N, % (95% CI)	77/377; 20.4 (16.3–24.5)	37/293; 12.6 (8.8–16.5)	14/31; 45.2 (26.6–63.7)	5/14; 35.7 (7.0–64.4)
Age, 15 ans et plus – n/N, % (95% CI)	68/377; 18.0 (14.1–21.9)	5/293; 1.7 (0.2–3.2)	0/31; 0.0 (0.0–0.0)	1/14; 7.1 (0.0–22.6)
Masculin – n/N, % (95% CI)	196/361; 54.3 (49.1–59.5)	116/214; 54.2 (47.5–60.9)	11/31; 35.5 (17.6–53.3)	5/14; 35.7 (7.0–64.4)
Signes cliniques				
Manifestations neurologiques – n/N, % (95% CI)				
Retard de développement	147/416; 35.3 (30.7–39.9)	142/353; 40.2 (35.1–45.4)	15/32; 46.9 (28.6–65.2)	10/22; 45.5 (22.9–68.1)
Hypotonie	64/416; 15.4 (11.9–18.9)	75/353; 21.2 (17.0–25.5)	2/32; 6.3 (0.0–15.1)	4/22; 18.2 (0.7–35.7)
Convulsions	59/416; 14.2 (10.8–17.5)	22/353; 6.2 (3.7–8.8)	1/32; 3.1 (0.0–9.5)	4/22; 18.2 (0.7–35.7)
Neuropathie périphérique	49/416; 11.8 (8.7–14.9)	3/353; 0.9 (0.0–1.8)	4/32; 12.5 (0.4–24.6)	8/22; 36.4 (14.5–58.2)
Troubles de la marche	46/416; 11.1 (8.0–14.1)	8/353; 2.3 (0.7–3.8)	9/32; 28.1 (11.7–44.6)	3/22; 13.6 (0.0–29.2)
Syndrome pyramidal	25/416; 6.0 (3.7–8.3)	9/353; 2.6 (0.9–4.2)	0/32; 0.0 (0.0–0.0)	2/22; 9.1 (0.0–22.1)
Microcéphalie	18/416; 4.3 (2.4–6.3)	2/353; 0.6 (0.0–1.4)	1/32; 3.1 (0.0–9.5)	2/22; 9.1 (0.0–22.1)
Syndrome extrapyramidal	12/416; 2.9 (1.3–4.5)	15/353; 4.3 (2.1–6.4)	1/32; 3.1 (0.0–9.5)	2/22; 9.1 (0.0–22.1)
Manifestations digestives – n/N, % (95% CI)				
Intolérance alimentaire	85/416; 20.4 (16.5–24.3)	97/353; 27.5 (22.8–32.2)	19/32; 59.4 (41.4–77.4)	3/22; 13.6 (0.0–29.2)
Manifestations ophtalmologiques – n/N, % (95% CI)				
Nystagmus	70/416; 16.8 (13.2–20.4)	0/353; 0.0 (0.0–0.0)	0/32; 0.0 (0.0–0.0)	3/22; 13.6 (0.0–29.2)
Maculopathie or rétinopathie	63/416; 15.1 (11.7–18.6)	4/353; 1.1 (0.0–2.2)	0/32; 0.0 (0.0–0.0)	0/22; 0.0 (0.0–0.0)
Strabisme	26/416; 6.3 (3.9–8.6)	0/353; 0.0 (0.0–0.0)	0/32; 0.0 (0.0–0.0)	0/22; 0.0 (0.0–0.0)
Manifestations psychiatriques – n/N, % (95% CI)				
Psychose	49/416; 11.8 (8.7–14.9)	2/353; 0.6 (0.0–1.4)	0/32; 0.0 (0.0–0.0)	1/22; 4.6 (0.0–14.0)
Troubles du comportement	22/416; 5.3 (3.1–7.5)	1/353; 0.3 (0.0–0.8)	0/32; 0.0 (0.0–0.0)	1/22; 4.6 (0.0–14.0)

Défaillance d'organe – n/N, % (95% CI)

Décès	31/416; 7.5 (4.9–10.0)	74/353; 21.0 (16.7–25.2)	0/32; 0.0 (0.0–0.0)	2/22; 9.1 (0.0–22.1)
Décompensation métabolique aiguë	13/416; 3.2 (1.5–4.8)	93/353; 26.3 (21.7–31.0)	2/32; 6.3 (0.0–15.1)	1/22; 4.6 (0.0–14.0)

Manifestations cardiovasculaires – n/N, % (95% CI)

Cardiomyopathie	21/416; 5.1 (2.9–7.2)	4/353; 1.1 (0.0–2.2)	1/32; 3.1 (0.0–9.5)	0/22; 0.0 (0.0–0.0)
Hypertension artérielle	19/416; 4.6 (2.6–6.6)	2/353; 0.6 (0.0–1.4)	0/32; 0.0 (0.0–0.0)	0/22; 0.0 (0.0–0.0)
Hypertension pulmonaire	13/416; 3.2 (1.5–4.8)	3/353; 0.9 (0.0–1.8)	0/32; 0.0 (0.0–0.0)	0/22; 0.0 (0.0–0.0)
Thrombose	10/416; 2.4 (0.9–3.9)	1/353; 0.3 (0.0–0.8)	1/32; 3.1 (0.0–9.5)	1/22; 4.6 (0.0–14.0)

Manifestations rénales – n/N, % (95% CI)

Insuffisance rénale aiguë or SHU	24/416; 5.8 (3.5–8.0)	12/353; 3.4 (1.5–5.3)	1/32; 3.1 (0.0–9.5)	1/22; 4.6 (0.0–14.0)
Maladies rénales chroniques	16/416; 3.9 (0.0–8.8)	36/353; 10.2 (7.0–13.4)	6/32; 18.8 (4.5–33.0)	0/22; 0.0 (0.0–0.0)

Autres manifestations – n/N, % (95% CI)

Retard de croissance intra-utérin	9/416; 2.2 (0.8–3.6)	2/353; 0.6 (0.0–1.4)	3/32; 9.4 (0.0–20.1)	1/22; 4.6 (0.0–14.0)
Grossesse	3/416; 0.7 (0.0–1.5)	1/353; 0.3 (0.0–0.8)	0/32; 0.0 (0.0–0.0)	0/22; 0.0 (0.0–0.0)
Manifestations cutanées	2/416; 0.5 (0.0–1.2)	1/353; 0.3 (0.0–0.8)	4/32; 12.5 (0.4–24.6)	0/22; 0.0 (0.0–0.0)
Goutte	0/416; 0.0 (0.0–0.0)	5/353; 1.4 (0.2–2.7)	0/32; 0.0 (0.0–0.0)	0/22; 0.0 (0.0–0.0)

Manifestations biologiques**Hématologie**

Anémie – n/N; % (95% CI)	52/416; 12.5 (9.3–15.7)	16/353; 4.5 (2.4–6.7)	25/32; 78.1 (63.0–93.3)	15/22; 68.2 (47.0–89.3)
Cytopénie – n/N; % (95% CI)	23/416; 5.5 (3.3–7.7)	8/353; 2.3 (0.7–3.8)	11/32; 34.4 (17.0–51.8)	3/22; 13.6 (0.0–29.2)
Hémoglobine (g/dL) – n; médiane (IQR)	37; 8.4 (7.1–10.4)	7; 9.2 (7.6–10.2)	18; 7.4 (5.4–11.2)	18; 7.5 (6.3–8.5)
Globules blancs (G/L) – n; médiane (IQR)	8; 3.945 (2.520–6.295)	6; 8.870 (5.250–16.800)	15; 5.980 (4.600–7.300)	1; 7.900 (—)
Plaquettes (G/L) – n; médiane (IQR)	15; 144 (87–231)	6; 313 (276–419)	14; 103 (55–198)	2; 165 (—)

Biochimie, sang – n, médiane (IQR)

Homocystéine (µmol/L)	237; 99 (65–146)	11; 6.0 (5.1–9.3)	22; 47 (26–60)	18; 93 (71–136)
Méthionine (µmol/L)	105; 12 (7–21)	5; 25 (14–33)	9; 19 (15–21)	17; 12 (5–21)
MMA (µmol/L)	72; 10 (3–25)	20; 270 (136–1040)	2; 14 (8–17)	0; -

C3-carnitine (µmol/L)	58; 7.8 (5.8–11.2)	43; 13.0 (9.8–19.1)	3; 5.7 (4.2–8.8)	0; -
Vitamine B ₁₂ (pmol/L)	24; 501 (399–767)	6; 348 (216–750)	17; 149 (82–375)	5; 151 (105–240)
Ammoniémie (µmol/L)	7; 54 (26–108)	35; 199 (141–367)	0; -	0; -
Biochimie, urine – n, médiane (IQR)				
MMA (mM/mol créatine)	109; 710 (216–2045)	95; 2903 (603–5699)	9; 154 (70–804)	0; -
Imagerie et explorations électrophysiologiques – n/N, % (95% CI)				
IRM cérébrale	100/416; 24.0 (19.9–28.2)	62/353; 17.6 (13.6–21.6)	4/32; 12.5 (0.4–24.6)	8/22; 26.5 (11.5–41.4)
Anomalie de signal	47/100; 47.0 (37.2–56.8)	36/62; 58.0 (46.7–71.3)	1/4; 25.0 (0.0–67.4)	4/8; 50.0 (15.4–84.6)
Atrophie cérébrale	42/100; 42.0 (32.3–51.7)	4/62; 6.4 (0.3–12.8)	2/4; 50.0 (1.0–99.0)	4/8; 50.0 (15.4–84.6)
Sans particularité	17/100; 17.0 (9.6–24.4)	25/62; 40.3 (28.6–53.3)	1/4; 25.0 (0.0–67.4)	2/8; 25.0 (0.0–55.0)
Anomalies EMG	20/416; 4.8 (2.7–6.9)	0/353; 0.0 (0.0–0.0)	1/32; 3.1 (0.0–20.8)	2/22; 9.1 (0.0–22.1)
Anomalies EEG (hors crise) [¶]	14/416; 3.4 (1.6–5.1)	1/353; 0.3 (0.0–0.8)	0/32; 0.0 (0.0–0.0)	2/22; 9.1 (0.0–22.1)
Traitement – n/N, % (95% CI)				
Supplémentation en vitamine B ₁₂	191/416; 45.9 (41.1–50.7)	73/353; 20.4 (15.6–25.2)	30/32; 93.8 (84.9–100.0)	21/22; 95.5 (86.0–100.0)
Transplantation hépatique	0/416; 0.0 (0.0–0.0)	16/353; 4.5 (2.4–6.7)	0/32; 0.0 (0.0–0.0)	0/22; 0.0 (0.0–0.0)
Transplantation rénale	0/416; 0.0 (0.0–0.0)	14/353; 4.0 (1.9–6.0)	0/32; 0.0 (0.0–0.0)	0/22; 0.0 (0.0–0.0)

Note. *MMACHC* : methylmalonic Aciduria and Homocystinuria type C protein ; MMA : acide méthylmalonique ; SHU : syndrome hémolytique et urémique ; IRM : imagerie par resonance magnétique ; EEG : électroencéphalogramme ; EMG : électromyogramme.

* Un patient a deux mutations sur le gène *ZNF143* qui n'appartient à aucun groupe fonctionnel de gènes.

† Le cluster de gène « Transport cytoplasmique » regroupe tous les patients avec des variants sur les gènes *MMACHC* ou *MMADHC* responsables d'une acidurie méthylmalonique avec hyperhomocystéinémie.

‡ Le cluster de gène « Mitochondrie » regroupe tous les patients avec des variants sur les gènes *MMAA*, *MMAB*, *MMUT* ou *MMADHC* responsables d'une acidurie méthylmalonique isolée.

§ Le cluster de gène « Reméthylation » regroupe tous les patients avec des variants sur les gènes *MTR*, *MTRR* ou *MMADHC* responsables d'une hyperhomocystéinémie isolée

|| Le cluster de gène « Biodisponibilité B₁₂ » regroupe tous les patients avec des variants sur les gènes *CBLIF* (alias, *GIF*), *CUBN*, *AMN*, *TCN2*, *LMBRD1*, *CD320*, ou *ABCD4*.

¶ Tracé EEG de fond pathologique hors évènement critique

Table 14. Prédicteurs cliniques, biologiques, d'imagerie et électrophysiologiques significativement associés aux groupes de gènes fonctionnels parmi les 824 patients atteints d'un trouble héréditaire du métabolisme de la vitamine B₁₂.

Prédicteur	P-value*	Bonferroni P-value	Beta (SE)	OR (95% IC)
Cluster de gènes "Biodisponibilité B₁₂"† vs. autres clusters de gènes				
Anémie	4.72×10 ⁻¹⁸	1.93×10 ⁻¹⁶	3.42 (0.44)	30.46 (12.78–72.60)
Cytopénie	1.68×10 ⁻⁷	5.38×10 ⁻⁶	2.46 (0.41)	11.66 (5.21–26.12)
Troubles de la marche	5.40×10 ⁻⁴	1.73×10 ⁻²	1.62 (0.42)	5.04 (2.23–11.40)
Difficultés alimentaires	2.18×10 ⁻⁵	6.99×10 ⁻⁴	1.57 (0.37)	4.79 (2.32–9.88)
Catégorie d'âge "1 à 14 ans"	5.12×10 ⁻⁴	1.64×10 ⁻²	1.36 (0.37)	3.91 (1.88–8.15)
Vitamine B ₁₂ (per 100 pmol/L)	9.36×10 ⁻⁵	3.65×10 ⁻³	-0.57 (0.19)	0.57 (0.39–0.82)
Cluster de gènes "Mitochondrie"‡ vs. autres clusters de gènes				
Décompensation métabolique aiguë	7.41×10 ⁻²³	3.48×10 ⁻²¹	2.32 (0.28)	10.15 (5.84–17.63)
Catégorie d'âge "0 à 1 an"	1.33×10 ⁻¹³	6.23×10 ⁻¹²	1.34 (0.19)	3.83 (2.62–5.62)
Décès	4.08×10 ⁻⁹	1.92×10 ⁻⁷	1.26 (0.22)	3.51 (2.27–5.44)
C3-carntine (µmol/L)	5.21×10 ⁻⁸	2.45×10 ⁻⁶	0.22 (0.05)	1.24 (1.12–1.38)
MMA, urine (par 500 mmol/mol créatinine)	6.29×10 ⁻⁹	2.96×10 ⁻⁷	0.15 (0.03)	1.17 (1.09–1.25)
MMA, sang (per 10 µmol/L)	2.00×10 ⁻⁴	9.40×10 ⁻³	0.13 (0.04)	1.14 (1.07–1.23)
Homocystéine (per 10 µmol/L)	4.00×10 ⁻⁴	1.88×10 ⁻²	-0.43 (0.12)	0.65 (0.51–0.83)
Catégorie d'âge "1 à 14 ans"	4.92×10 ⁻⁴	2.31×10 ⁻²	-0.71 (0.21)	0.49 (0.32–0.74)
Convulsion	4.36×10 ⁻⁴	2.05×10 ⁻²	-0.86 (0.26)	0.42 (0.25–0.70)
Cytopénie	2.33×10 ⁻⁴	1.09×10 ⁻²	-1.30 (0.40)	0.27 (0.12–0.59)
Anémie	2.21×10 ⁻¹¹	1.08×10 ⁻⁹	-1.63 (0.28)	0.20 (0.11–0.34)
Troubles de la marche	1.55×10 ⁻⁸	7.28×10 ⁻⁷	-1.80 (0.38)	0.16 (0.08–0.35)
Hypertension artérielle	6.20×10 ⁻⁴	2.91×10 ⁻²	-2.00 (0.75)	0.14 (0.03–0.58)
Microcéphalie	2.21×10 ⁻⁴	1.04×10 ⁻²	-2.11 (0.74)	0.12 (0.03–0.52)
Catégorie d'âge "15 ans et plus"	2.33×10 ⁻¹²	1.09×10 ⁻¹⁰	-2.42 (0.47)	0.09 (0.04–0.22)
Anomalies EEG §	4.74×10 ⁻⁴	2.23×10 ⁻²	-2.52 (1.03)	0.08 (0.01–0.61)
Maculopathie ou rétinopathie	1.29×10 ⁻¹²	6.07×10 ⁻¹¹	-2.60 (0.52)	0.07 (0.03–0.21)
Neuropathie périphérique	4.51×10 ⁻¹³	2.12×10 ⁻¹¹	-2.86 (0.60)	0.06 (0.02–0.18)
Troubles du comportement	9.60×10 ⁻⁶	4.51×10 ⁻⁴	-2.90 (1.02)	0.06 (0.01–0.41)
Psychose	2.38×10 ⁻¹¹	1.12×10 ⁻⁹	-3.04 (0.72)	0.05 (0.01–0.20)
Cluster de gènes "Transport cytoplasmique" vs. autres clusters de gènes				
Nystagmus	2.81×10 ⁻¹⁹	1.41×10 ⁻¹⁷	3.30 (0.59)	27.24 (8.50–87.30)
Maculopathie ou rétinopathie	5.02×10 ⁻¹⁶	2.51×10 ⁻¹⁴	2.89 (0.52)	17.98 (6.48–49.90)
Psychose	1.01×10 ⁻¹²	5.05×10 ⁻¹¹	2.89 (0.60)	17.98 (5.56–58.18)

Catégorie d'âge "15 ans et plus"	1.14×10 ⁻¹⁴	5.71×10 ⁻¹³	2.50 (0.43)	12.18 (5.21–28.46)
Troubles du comportement	9.77×10 ⁻⁶	4.88×10 ⁻⁴	2.43 (0.74)	11.31 (2.64–48.41)
Hypertension artérielle	6.73×10 ⁻⁵	3.37×10 ⁻³	2.27 (0.75)	9.69 (2.24–41.88)
Anomalies EMG	1.78×10 ⁻⁴	8.88×10 ⁻³	1.92 (0.62)	6.80 (2.01–23.07)
Neuropathie périphérique	8.82×10 ⁻⁶	4.41×10 ⁻⁴	1.25 (0.30)	3.49 (1.92–6.33)
Convulsions	3.43×10 ⁻⁴	1.72×10 ⁻²	0.84 (0.24)	2.33 (1.44–3.75)
Homocystéine (par 10 µmol/L)	1.00×10 ⁻⁴	5.00×10 ⁻³	0.13 (0.03)	1.14 (1.07–1.22)
MMA, sang (per 10 µmol/L)	3.00×10 ⁻⁴	1.50×10 ⁻²	-0.12 (0.03)	0.89 (0.83–0.95)
MMA, urine (par 500 mmol/mol créatinine)	1.00×10 ⁻⁴	5.00×10 ⁻³	-0.13 (0.03)	0.88 (0.83–0.94)
C3-Carnitine (µmol/L)	8.36×10 ⁻⁷	4.18×10 ⁻⁵	-0.18 (0.05)	0.83 (0.75–0.92)
Catégorie d'âge "0 à 1 an"	2.05×10 ⁻⁹	1.03×10 ⁻⁷	-1.02 (0.18)	0.36 (0.25–0.51)
Décès	1.25×10 ⁻⁶	6.23×10 ⁻⁵	-1.05 (0.23)	0.35 (0.23–0.55)
Maladie rénale chronique	2.28×10 ⁻⁴	1.14×10 ⁻²	-1.06 (0.30)	0.35 (0.19–0.63)
Décompensation métabolique aiguë	7.32×10 ⁻²⁰	3.66×10 ⁻¹⁸	-2.26 (0.31)	0.10 (0.06–0.19)
Cluster de gènes "Reméthylation" ¶ vs. autres clusters de gènes				
Anémie	1.16×10 ⁻⁹	4.64×10 ⁻⁸	2.79 (0.47)	16.31 (6.48–41.05)
Neuropathie périphérique	1.07×10 ⁻⁴	4.08×10 ⁻³	2.03 (0.46)	7.60 (3.06–18.89)
Cluster de gènes "Transport cytoplasmique" vs. "Biodisponibilité B₁₂" † (reference)				
Vitamine B ₁₂ (per 100 pmol/L)	1.00×10 ⁻⁶	4.50×10 ⁻⁵	0.95 (0.30)	2.58 (1.44–4.63)
Homocystéine (per 10 µmol/L)	1.00×10 ⁻⁴	4.20×10 ⁻³	0.26 (0.07)	1.30 (1.14–1.49)
Difficultés alimentaires	4.61×10 ⁻⁶	1.94×10 ⁻⁴	-1.74 (0.38)	0.18 (0.08–0.37)
Cytopénie	3.33×10 ⁻⁶	1.40×10 ⁻⁴	-2.19 (0.43)	0.11 (0.05–0.26)
Anémie	1.22×10 ⁻¹⁵	5.38×10 ⁻¹⁴	-3.22 (0.45)	0.04 (0.02–0.10)

Note. SE : erreur standard ; OR : odds ratio; IRM : imagerie par résonance magnétique ; *MMACHC* : Methylmalonic Aciduria and Homocystinuria type C protein ; MMA : acide méthylmalonique ; EEG : électroencéphalogramme ; EMG : électromyogramme.

* Régression logistique en analyse univariée

† Le cluster de gène « Biodisponibilité B₁₂ » regroupe tous les patients avec des variants sur les gènes *CBLIF* (alias, *GIF*), *CUBN*, *AMN*, *TCN2*, *LMBRD1*, *CD320*, ou *ABCD4*.

‡ Le cluster de gène « Mitochondrie » regroupe tous les patients avec des variants sur les gènes *MMAA*, *MMAB*, *MMUT* ou *MMADHC* responsables d'une acidurie méthylmalonique isolée.

§ Tracé EEG de fond pathologique hors évènement critique.

|| Le cluster de gène « Transport cytoplasmique » regroupe tous les patients avec des variants sur les gènes *MMACHC* ou *MMADHC* responsables d'une acidurie méthylmalonique avec hyperhomocystéinémie.

¶ Le cluster de gène « Reméthylation » regroupe tous les patients avec des variants sur les gènes *MTR*, *MTRR* ou *MMADHC* responsables d'une hyperhomocystéinémie isolée

2.3.4.3 Cluster fonctionnel de gènes « Biodisponibilité B₁₂ »

32 patients rapportés présentent un variant sur un gène du groupe fonctionnel « Biodisponibilité B₁₂ ». L'âge médian au début des symptômes est de 0,3 ans (IQR 0,2–2,1). 54,8% (17/31) des patients avaient moins d'un an et 45,2% entre 1 et 14 ans inclus (14/31) (**Table 13**). L'anémie est la manifestation la plus fréquemment rapportée (78,1%, 25/32), suivie des troubles digestifs (59,4%, 19/32) et du retard de développement (46,9%, 15/32). Il n'y a ni convulsions, ni anomalies électroencéphalographique rapportées. Aucun patient ne présentait de manifestations ophtalmologiques ou psychiatriques. Un seul patient présentait des manifestations cardiologiques. Une insuffisance rénale chronique est observée dans 18,8% des cas (6/32), une atteinte cutanée dans 12,5% (4/32) et un retard de croissance intra-utérin dans 9,4% (3/32). Une cytopénie est rapportée pour 34,4% des patients (11/32), malgré une supplémentation en vitamine B₁₂ dans 93,8% des cas (30/32).

Selon une régression logistique avec correction de Bonferroni, les éléments suivant sont significativement associés avec une mutation d'un gène du cluster « Biodisponibilité B₁₂ »: Cytopénie (OR : 11,66 ; 95% CI: 5,21–26,12) ; troubles de la marche (OR : 5,04 ; 95% CI : 2,23–11,40); difficultés alimentaires (OR : 4,79 ; 95% CI : 2,32–9,88) ; catégorie d'âge "1 à 14 ans" (OR : 3,91 ; 95% CI : 1,88–8,15), et diminution du taux de vitamine B₁₂ (par 100 pmol/L) (OR : 0,57 ; 95% CI : 0,39–0,82) (**Table 14 et Figure 25A**).

2.3.4.4 Cluster fonctionnel de gènes « Reméthylation »

Nous avons identifié 22 patients comme porteur de mutations pathologiques sur un gène du cluster « Reméthylation ». L'âge médian des patients au début des symptômes est de 0,3 ans (IQR : 0,1–5,0), 57,1% des patients avaient moins de 1 an, et 1 patient avait plus de 15 ans (7,1%) (**Table 13**). L'anémie est la manifestation prédominante, observée dans 68,2% des cas (15/22). Les manifestations neurologiques sont également fréquentes : 45,5% (10/22) des patients avaient un retard de développement, 36,4% (8/22) présentaient une neuropathie périphérique, 18,2% (4/22) des convulsions ainsi qu'une hypotonie. L'analyse par régression logistique avec correction de Bonferroni a identifié la neuropathie périphérique (OR : 7,60 ; 95% CI : 3,06–18,89) comme élément associé à une mutation d'un gène du cluster « Reméthylation » comparé aux autres clusters de gène (**Table 14 et Figure 25B**).

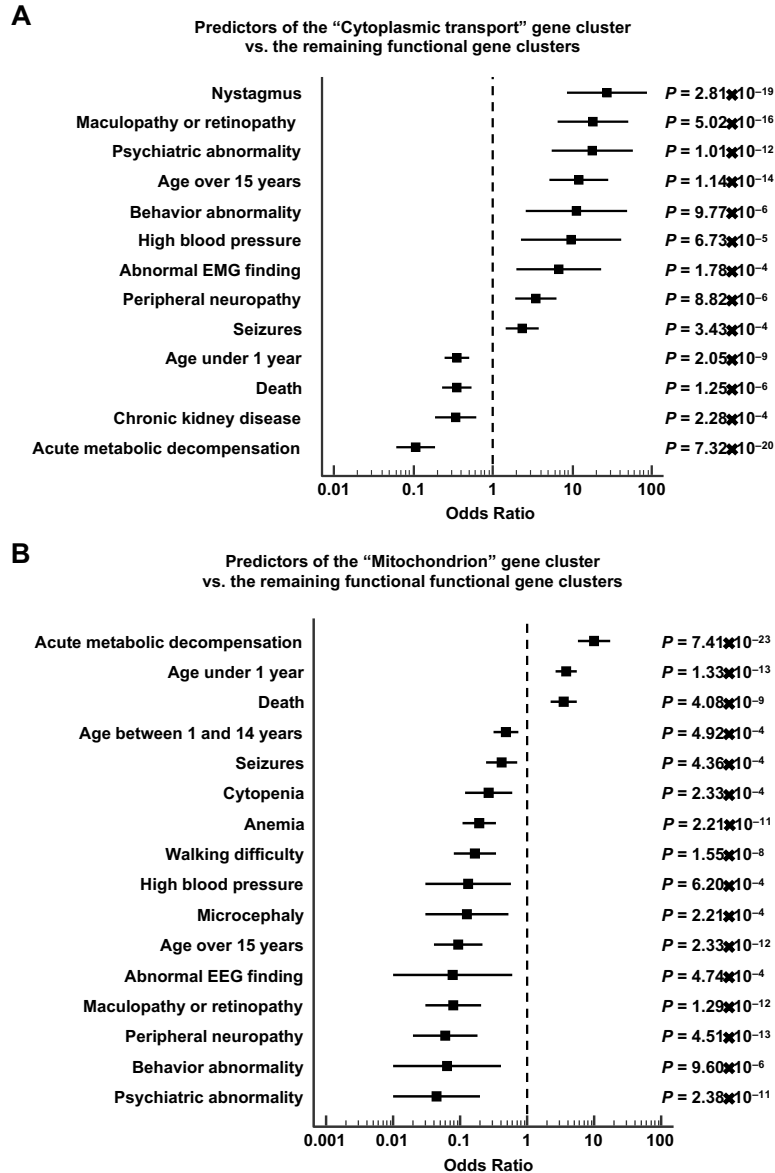


Figure 24. (A) Prédicteurs du cluster de gènes « Transport cytoplasmique » par rapport aux autres groupes de gènes fonctionnels. Seules les variables binaires sont représentées dans le diagramme de Forest. Le groupe de gènes « Transport cytoplasmique » : regroupe tous les patients présentant des variants *MMACHC* et *MMADHC* responsables d'anomalies combinées de la mitochondrie et de la reméthylation ; **(B) Prédicteurs du groupe de gènes « Mitochondrie »** par rapport aux autres groupes de gènes fonctionnels. Seules les variables binaires sont représentées dans le diagramme de Forest. Le groupe de gènes « Mitochondrie » : regroupe tous les patients présentant des variants *MMAA*, *MMAB* ou *MMUT* et des variants *MMADHC* responsables d'anomalies de la mitochondrie. OR : odds ratio ; EMG : électromyogramme ; EEG : électroencéphalogramme.

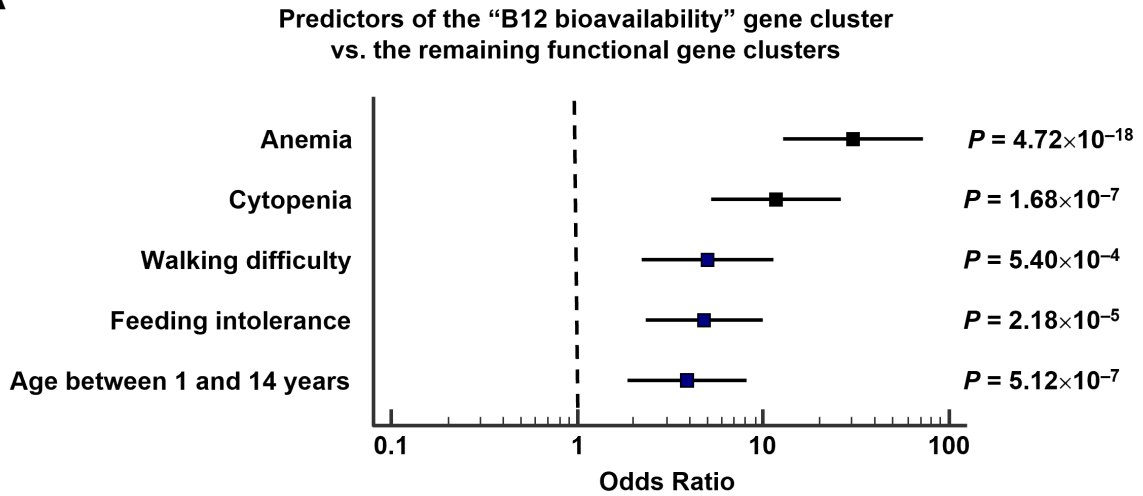
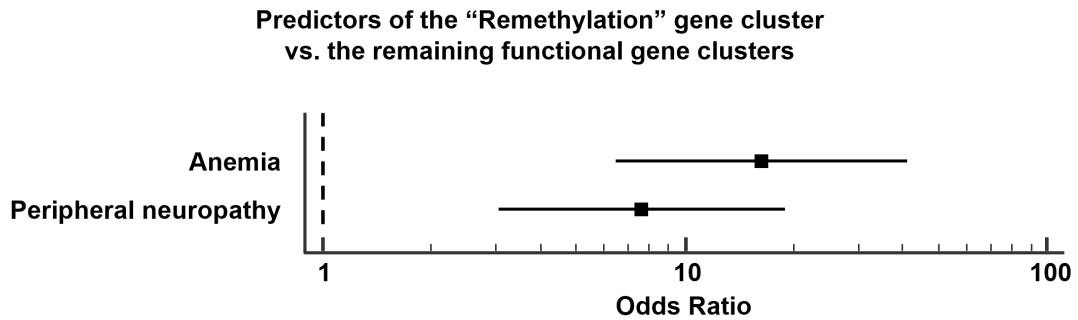
A**B**

Figure 25. (A) Forest plot illustrant les résultats de l'analyse de régression logistique qui a évalué les prédicteurs du groupe de gènes "Biodisponibilité B₁₂" par rapport aux autres groupes de gènes fonctionnels. Seules les variables binaires sont représentées dans le diagramme de Forest. Le groupe de gènes "Biodisponibilité B₁₂" : regroupe tous les patients présentant les variants *CBLIF* (alias, *GIF*), *CUBN*, *AMN*, *TCN2*, *LMBRD1*, *CD320* ou *ABCD4* ;

(B) Forest plot illustrant les résultats de l'analyse de régression logistique qui a évalué les prédicteurs du groupe de gènes "Reméthylation" par rapport aux autres groupes fonctionnels de gènes. OR : odds ratio.

2.3.5 Anomalies métaboliques associées à la survenue d'une anémie, de manifestations neurologiques, des deux ou d'aucune des deux

Les manifestations hématologiques associées à des manifestations neurologiques ont été principalement observées dans le groupe de gènes « Biodisponibilité B₁₂ » avec chez les patients, une augmentation combinée de l'homocystéine et de l'acide méthylmalonique et une diminution de la méthionine. La concentration en méthionine est significativement plus basse en cas d'anémie (associée ou non à des manifestations neurologiques) que dans les cas avec manifestations neurologiques isolées. Les taux urinaires d'acide méthylmalonique sont significativement plus bas en cas d'anémie associée à une atteinte neurologique que dans les cas sans anémie (**Table 15**).

2.3.6 Facteurs prédictifs de mortalité

Une analyse par régression logistique avec correction de Bonferroni a permis d'identifier différents éléments comme étant associés à un risque de mortalité : l'hypertension artérielle pulmonaire (OR : 7,08 ; 95% CI : 2,60–19,29) ; la mutation d'un gène du cluster « Mitochondrie » (OR : 3,51 ; 95% CI : 2,27–5,44) ; la mutation du gène *MMUT* (OR : 3,47 ; 95% CI : 2,29–5,25) ; la survenue de décompensation métabolique aigüe (OR : 3,29 ; 95% CI : 2,04–5,31) ; la catégorie d'âge « 0 à 1 an » (OR : 2,84 ; 95% CI : 1,58–5,12).

A l'inverse, les éléments suivants sont significativement associés à une diminution du risque de décès : la mutation du gène *MMACHC* (OR : 0,36 ; 95% CI : 0,23–0,56) ; la mutation d'un gène du cluster fonctionnel « Transport cytoplasmique » (OR : 0,35 ; 95% CI : 0,23–0,55) et la présence de nystagmus (OR : 0,08 ; 95% CI : 0,01–0,60) (**Table 16** et **Figure 26**).

Table 15. Comparaison des résultats biologiques en fonction de la présence d'une anémie, de manifestations neurologiques, des deux ou d'aucune de ces deux manifestations.

Manifestation biologique (unité) –n, médiane (IQR)	Anémie sans signes neurologiques (1)	Anémie et signes neurologiques associés (2)	Signes neurologiques sans anémie (3)	Absence d'anémie et de signes neurologiques (4)	P-value*	Analyse post-hoc (Conover test) <i>P</i> < 0.05
Méthionine (µmol/L)	22; 18.5 (13.0–27.0)	18; 6.0 (4.0–11.0)	36; 11.1 (8.4–18.5)	60; 13.7 (7.3–23.0)	0.002	(1) vs. (2)(3) (2) vs. (1)(3)(4) (3) vs. (1)(2) (4) vs. (2)
Vitamine B₁₂ (pmol/L)	26; 401 (151–580)	16; 399 (215–648)	12; 929 (416–5576)	Faible taille d'échantillon	0.03	(1) vs. (3) (3) vs. (1)
MMA, urine (mM/mol créatine)	22; 336 (84–1056)	13; 632 (362–2910)	103; 2108 (310–5328)	Absence de données	0.003	(1) vs. (3) (3) vs. (1)
Homocystéine (µmol/L)	43; 74.0 (44.0–143.5)	30; 79.0 (35.0–128.0)	129; 99.0 (69.8–130.3)	86; 86.0 (44.0–152.0)	0.24	—
MMA, sang (µmol/L)	7; 14.4 (7.9–278.3)	8; 6.6 (1.7–69.0)	41; 23.0 (5.9–108.5)	38; 8.9 (3.3–30.0)	0.12	—
C3 (µmol/L)	6; 8.6 (5.7–9.9)	7; 10.5 (6.2–11.7)	54; 11.4 (7.4–14.5)	38; 7.9 (6.5–13.5)	0.33	—
Ammoniémie (µmol/L)	Faible taille d'échantillon	Faible taille d'échantillon	25; 247 (150–468)	Faible taille d'échantillon	0.11	—
Hémoglobine (g/dL)	47; 7.8 (6.2–10.3)	29; 7.4 (6.8–9.9)	Faible taille d'échantillon	Faible taille d'échantillon	0.97	—
Plaquettes (G/L)	25; 175 (94–262)	11; 111 (333–265)	Faible taille d'échantillon	Faible taille d'échantillon	0.38	—
Globules blancs (G/L)	16; 4.600 (5.615–7.200)	12; 2.770 (5.140–9.465)	Faible taille d'échantillon	Faible taille d'échantillon	0.45	—

Note. MMA : acide méthylmalonique

* Test de Kruskal-Wallis.

† L'analyse post-hoc des comparaisons multiples par paire à l'aide du test de Conover n'a pas été effectuée lorsque la valeur P du test de Kruskal-Wallis était ≥0,05.

Table 16. Prédicteurs cliniques, biologiques, d'imagerie et électrophysiologiques significativement associés au décès parmi les 824 patients atteints d'un trouble héréditaire du métabolisme de la vitamine B₁₂.

Predictor	P-value*	Bonferroni P-value	Beta (SE)	OR (95% IC)
Hypertension pulmonaire	3.17×10 ⁻⁴	1.81×10 ⁻²	1.96 (0.51)	7.08 (2.60–19.29)
Cluster de gène Mitochondrie†	4.08×10 ⁻⁹	2.33×10 ⁻⁷	1.26 (0.22)	3.51 (2.27–5.44)
Gene <i>MMUT</i>	3.45×10 ⁻⁹	1.97×10 ⁻⁷	1.24 (0.21)	3.47 (2.29–5.25)
Décompensation métabolique aiguë	3.80×10 ⁻⁶	2.16×10 ⁻⁴	1.19 (0.24)	3.29 (2.04–5.31)
Catégorie d'âge de 0 à 1 an	1.31×10 ⁻⁴	7.47×10 ⁻³	1.04 (0.30)	2.84 (1.58–5.12)
Gene <i>MMACHC</i>	2.19×10 ⁻⁶	1.25×10 ⁻⁴	-1.02 (0.23)	0.36 (0.23–0.56)
Cluster de gènes : « Transport cytoplasmique » ‡	1.25×10 ⁻⁶	7.10×10 ⁻⁵	-1.05 (0.23)	0.35 (0.23–0.55)
Réalisation d'un IRM cérébral	4.04×10 ⁻⁴	2.30×10 ⁻²	-1.08 (0.34)	0.34 (0.17–0.67)
Nystagmus	1.17×10 ⁻⁴	6.65×10 ⁻³	-2.50 (1.01)	0.08 (0.01–0.60)

Note. SE : erreur standard ; OR: odds ratio ; MRI: imagerie par resonance magnétique ; *MMACHC* : Methylmalonic Aciduria and Homocystinuria type C protein.

* Analyse univarié par régression logistique.

† ‡ Le cluster de gène « Mitochondrie » regroupe tous les patients avec des variants sur les gènes *MMAA*, *MMAB*, *MMUT* ou *MMADHC* responsables d'une acidurie méthylmalonique isolée.

‡ Le cluster de gène « Transport cytoplasmique » regroupe tous les patients avec des variants sur les gènes *MMACHC* ou *MMADHC* responsables d'une acidurie méthylmalonique avec hyperhomocystéinémie.

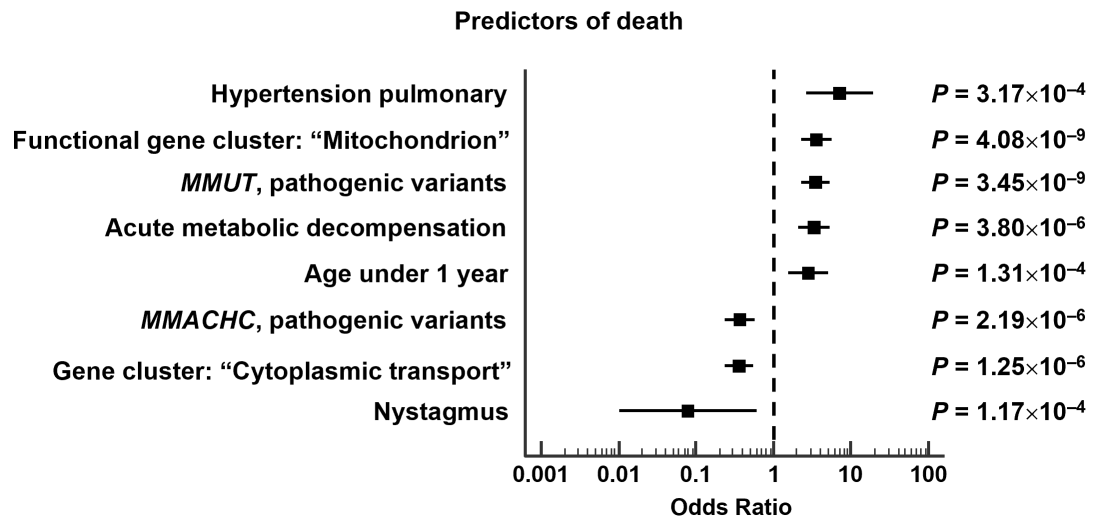


Figure 26. Prédicteurs de décès.

Forest plot illustrant les résultats de l'analyse par régression logistique.

OR : odd ratio ; MRI : Imagerie par résonance magnétique.

Table 17. Comparaison des caractéristiques cliniques, biologiques et d'imagerie entre les 161 patients atteints de *CbIC* décrits dans le registre E-HOD et les 416 patients issus du groupe de gènes "Transport cytoplasmique transport" de la méta-analyse.

	E-HOD registry - <i>CbIC</i> n = 161	Individual Patient Data Meta-Analysis, "Cytoplasmic transport" Cluster, n = 416	P-value
Caractéristiques des patients			
Genre (masculin) — n/N, %	93/161, 57.7%	196/361, 54.3%	0.47
Diagnostique pré-natal — n/N, %	47/161, 29.2%	38/416*, 9.1%	< 0.0001
Age aux premiers symptômes (ans) — n, médiane (IQR)	93, 0.1 (0.0–0.3)	377, 0.3 (0.0–10.3)	NS
Mutations rapportées — n/N, %	117/191, 61.3%	416/416, 100%	< 0.0001
Manifestations cliniques — n/N, %			
<i>Manifestations thrombo-emboliques</i>			
Accident vasculaire cérébral	3/113, 2.7%	8/416, 1.9%	0.60
Thrombose	5/113, 4.4%	10/416, 2.4%	0.26
<i>Manifestations rénales</i>			
Syndrome hémolytique et urémique	17/113, 15.0%	24/416, 5.8%	0.001
Maladie rénale chronique	2/113, 1.7%	16/416, 3.9%	0.25
<i>Manifestations cardiaques</i>			
Cardiomyopathie / Malformation cardiaque	5/113, 8.8%	21/416, 5.1%	0.14
Arrêt cardiaque/ Insuffisance cardiaque / Décès	2/113, 1.7%	31/416, 7.5%	0.02
Hypertension artérielle	3/113, 2.7%	19/416, 4.6%	0.37
<i>Manifestations digestives et hépatiques</i>			
Difficultés alimentaires	68/113, 60%	85/416, 20.4%	<0.0001
Hépatomegalie	9/113, 8.0%	6/416, 1.4%	0.0002
<i>Défaillance d'organe</i>			
Décompensation métabolique aiguë	20/113, 18%	13/416, 3.2%	< 0.0001
<i>Manifestations ophtalmologiques</i>			
Signes ophtalmologiques (Atteinte du nerf optique)	20/113, 18%	100/416, 24.0%	0.18

Nystagmus	NR in E-HOD registry	70/416, 16.8%	No data for comparison
Maculopathie ou rétinopathie	NR in E-HOD registry	63/416, 15.1%	No data for comparison
Strabisme	NR in E-HOD registry	26/416, 6.3%	No data for comparison
<i>Manifestations psychiatriques</i>			
Psychose	6/113, 5%	49/416, 11.8%	0.04
Troubles du comportement	NR	22/416, 5.3%	No data for comparison
<i>Manifestations neurologiques</i>			
Hypotonie	38/113, 34%	64/416, 15.4%	< 0.0001
Retard de développement	26/113, 23%	147/416, 35.3%	0.01
Convulsions	19/113, 17%	59/416, 14.2%	0.46
Malformations cérébrales	3/113, 3%	Not reported in the study	No data for comparison
Microcéphalie	9/113, 8%	18/416, 4.3%	0.11
Hydrocéphalie	5/113, 4%	Not reported in the study	No data for comparison
Myélopathie	4/113, 3%	49/416; 11.8%	0.006
Neuropathie périphérique	NR in E-HOD registry	49/416; 11.8%	No data for comparison
Troubles de la marche	NR in E-HOD registry	46/416; 11.1%	No data for comparison
Syndrome pyramidal	NR in E-HOD registry	25/416; 6.0%	No data for comparison
Syndrome extrapyramidal	NR in E-HOD registry	12/416; 2.9%	No data for comparison
Anomalies biologiques			
Homocysteine avant traitement $\mu\text{mol/L}$ – n, médiane (IQR)	139, 123 (65–197)	237, 99 (65–146)	NS
Anémie — n/N, %	32/113, 28%	52/416, 12.5%	0.0001

Anomalies d'imagerie			
Anomalies de signal sur IRM	NR in E-HOD registry	47/100; 47.0%	No data for comparison
Atrophie cérébrale	NR in E-HOD registry	42/100; 42.0%	No data for comparison
Anomalie EMG	NR in E-HOD registry	20/416; 4.8%	No data for comparison

Note. NR: not reported; NS: not significant.

* Les 38 enfants diagnostiqués par dépistage néonatal sont rapportés dans la **Table 18**.

Table 18. Liste des dix publications incluant des patients diagnostiqués par dépistage néonatal

First author	Year	Patient	Gene	Individual information reported
Arhens-Nicklas	2015	I	<i>MMACHC</i>	Asymptomatic during the neonatal period – biological values at NS
Armour	2013	I	<i>ABCD4</i>	Asymptomatic during the neonatal period – biological values at NS
Lin	2009	I	<i>MMACHC</i>	Asymptomatic during the neonatal period – No biological information
Lin	2009	II	<i>MMACHC</i>	Asymptomatic during the neonatal period – No biological information
Lin	2009	III	<i>MMACHC</i>	Asymptomatic during the neonatal period – biological values at NS
Lin	2009	IV	<i>MMACHC</i>	Asymptomatic during the neonatal period – No biological information
Lin	2009	V	<i>MMACHC</i>	Asymptomatic during the neonatal period – No biological information
Lin	2009	VI	<i>MMACHC</i>	Asymptomatic during the neonatal period – biological values
Lin	2009	VII	<i>MMACHC</i>	No neonatal clinical data – biological values at NS
Han	2015	I	<i>MMUT</i>	No neonatal clinical data – biological values at NS
Han	2015	II	<i>MMUT</i>	No neonatal clinical data – biological values at NS
Han	2015	III	<i>MMUT</i>	No neonatal clinical data – biological values at NS
Han	2015	V	<i>MMACHC</i>	No neonatal clinical data – biological values at NS
Han	2015	VI	<i>MMACHC</i>	No neonatal clinical data – biological values at NS
Han	2015	VII	<i>MMACHC</i>	No neonatal clinical data – biological values at NS
Han	2015	VIII	<i>MMACHC</i>	No neonatal clinical data – biological values at NS
Nogueira	2017	XV	<i>MMACHC</i>	No neonatal clinical data – biological values at NS
Nogueira	2017	XVI	<i>MMACHC</i>	No neonatal clinical data – biological values at NS
Nogueira	2017	XVII	<i>MMACHC</i>	No neonatal clinical data – biological values at NS
Nogueira	2017	XVIII	<i>MMACHC</i>	No neonatal clinical data – biological values at NS
Nogueira	2017	XIX	<i>MMACHC</i>	No neonatal clinical data – biological values at NS
Nogueira	2017	XX	<i>MMACHC</i>	No neonatal clinical data – biological values at NS
Nogueira	2017	XXI	<i>MMACHC</i>	No neonatal clinical data – biological values at NS

Nogueira	2017	XXII	<i>MMACHC</i>	No neonatal clinical data – biological values at NS
Nogueira	2017	XXIII	<i>MMACHC</i>	No neonatal clinical data – biological values at NS
Nogueira	2017	XIV	<i>MMACHC</i>	No neonatal clinical data – biological values at NS
Nogueira	2017	XV	<i>MMADHC</i>	No neonatal clinical data – biological values at NS
Quadros	2010	I	<i>CD320</i>	Asymptomatic on the second day of life – biological values at NS
Underfill	2013	I	<i>MMUT</i>	Asymptomatic during the neonatal period – biological values at NS
Underfill	2013	II	<i>MMUT</i>	Asymptomatic during the neonatal period – biological values at NS
Trefz	2016	I	<i>MMACHC</i>	Intrauterine treatment – No clinical data – biological values at birth
Wong	2016	I	<i>MTR</i>	Diagnosis at day 14 of life – Asymptomatic – biological values
Wong	2016	II	<i>MTRR</i>	Diagnosis at day 6 of life – Asymptomatic – biological values
Zhou	2019	V	<i>MMACHC</i>	Diagnosis at day 10 of life – Asymptomatic – biological values
Zhou	2019	VI	<i>MMACHC</i>	Diagnosis at day 15 of life – Asymptomatic – biological values
Zhou	2019	XI	<i>MMACHC</i>	Diagnosis at day 18 of life – Asymptomatic – biological values
Zhou	2019	P2	<i>MMUT</i>	Diagnosis at day 9 of life – Asymptomatic – biological values
Zhou	2019	P3	<i>MMUT</i>	Diagnosis at day 3 of life – Asymptomatic – biological values

Note. NS : Dépistage néonatal ; *MMACHC*: Methylmalonic Aciduria and Homocystinuria type C protein ; *MMUT* : Methylmalonyl-CoA Mutase; *MMADHC* : Methylmalonic Aciduria and Homocystinuria type D protein ; *MTR* : methionine synthase ; *MTRR*: methionine synthase reductase

2.4 Discussion

Notre étude est la première à rapporter les caractéristiques cliniques et métaboliques d'un groupe de maladies rares du métabolisme, par une extraction systématique des données individuelles de plus de 800 patients ayant un déficit du métabolisme de la vitamine B₁₂ génétiquement documenté. Nous avons extrait toutes les manifestations décrites et construit une base de données qui nous a permis de caractériser les principales manifestations cliniques et biologiques en fonction de l'âge d'apparitions des symptômes et de groupes fonctionnels de gènes. Jusqu'à présent, les caractéristiques de ce groupe de maladies n'avaient été rapportées que dans des revues narratives, des registres centrés sur le recrutement pédiatrique ou seulement sur un nombre restreint de ces pathologies.

Nous avons classé les patients dans des catégories d'âge en fonction du recours de la population à des spécialités médicales différentes (201). Au cours de la première année de vie, les manifestations cliniques peuvent être sévères et nécessitent une expertise pédiatrique (200). La période de la vie après 15 ans comprend la fin de l'adolescence (15-19 ans) et le jeune âge adulte (20-24 ans). Dans cette période, le recours à un pédiatre est moins courant, et la plupart des patients sont pris en charge dans des structures de médecine adulte ou examinés par des médecins de famille (201, 202). Notre étude a mis en évidence la forte association des manifestations selon l'âge et les groupes de gènes fonctionnels. Nous avons montré que les manifestations cliniques diagnostiquées à la fin de l'adolescence/à l'âge adulte diffèrent de celles observées habituellement dans la pratique pédiatrique. Nous soulignons la nécessité d'évoquer des causes rares à ces manifestations, telles que les erreurs innées du métabolisme intracellulaire de la vitamine B₁₂ trop souvent méconnues.

Notre étude montre que les patients de plus de 15 ans ont une présentation clinique distincte des nouveau-nés et des enfants, avec des variants génétiques moins pathogènes. En particulier, nous avons observé une forte association des manifestations neurologiques et cardiovasculaires, comme le montre la **Figure 23**. Certaines manifestations prédominent également dans l'un des quatre groupes fonctionnels de gènes. Ces manifestations pourraient refléter des mécanismes physiopathologiques spécifiques liés à une altération de la synthèse de la méthionine ou au contraire au catabolisme du méthylmalonyl-CoA. Par exemple, les neuropathies

périphériques et les manifestations psychiatriques sont rapportées de manière prédominante dans le cluster "Reméthylation", les épisodes de décompensation métabolique aiguë, les manifestations rénales ou le syndrome hémolytique et urémique sont plus fréquemment rapportés dans le cluster "Mitochondrie", et les manifestations cardiovasculaires et ophtalmologiques dans le cluster "Transport cytoplasmique". L'anémie est principalement rapportée dans les clusters liés à la disponibilité de la vitamine B₁₂ et à la voie de reméthylation (**Table 13**).

Les manifestations hématologiques sont principalement rapportées chez les enfants mais dans des proportions moins fréquentes que dans les revues dédiées aux manifestations des erreurs innées de la vitamine B₁₂ (188, 203, 204). Dans le cluster « Biodisponibilité B₁₂ », nous avons observé que les cas avec anémie et sans manifestations neurologiques présentaient un taux de méthionine plus élevé avec un acide méthylmalonique plus faible par rapport aux cas avec manifestations neurologiques sans anémie associée. Les taux d'homocystéine n'étaient pas différents (**Table 15**). Ces différences métaboliques illustrent la nécessité d'étudier les mécanismes moléculaires qui pourraient être responsables d'une altération de la production des globules rouges par rapport aux manifestations neurologiques. En ce sens, nous pouvons évoquer l'utilisation et l'adressage de la cobalamine par la MS et la MUT, l'interactome de MS avec la méthionine synthase réductase, ainsi que les protéines MMACHC et MMADHC (205, 206). Le statut cellulaire en folates pourrait jouer un rôle dans l'augmentation de la concentration en acide méthylmalonique observée dans les cas du cluster « Biodisponibilité B₁₂ » avec des manifestations neurologiques. En effet, un statut élevé en folates augmente l'acide méthylmalonique chez les sujets ayant une faible concentration sanguine en B₁₂ (207).

Des manifestations neurologiques telles que des troubles de la marche, une neuropathie périphérique et un syndrome pyramidal ont été observées chez près d'un tiers des patients de plus de 15 ans. Ces manifestations sont fortement associées à l'âge. Les IRM cérébraux ont montré une augmentation de l'atrophie cérébrale avec l'âge : 60 % des cas rapportés à l'âge adulte, contre seulement 13 % dans la première année de vie (**Table 9** et **Figure 23**). Ces données sont cohérentes avec les études de cohorte de sujets âgés, qui ont montré un lien entre le développement d'une atrophie cérébrale au cours du vieillissement et un effet préventif de la vitamine B₁₂ (208, 209). Ces manifestations semblent lier à l'altération de la synthèse endogène de méthionine. En effet, elles ont été principalement observées chez les patients des

clusters de gènes « Reméthylation » et « Transport cytoplasmique », et non chez ceux du cluster « Mitochondrie », comme le montre la **Table 13**. Ces résultats sont cohérents avec des études expérimentales récentes sur des modèles cellulaires, des fibroblastes de patients et des modèles animaux. Dans ces études, le déficit en B₁₂ modifie le transport nucléo-cytoplasmique et l'épissage des ARNm et augmente le stress du réticulum endoplasmique (210-212). L'altération de la circulation des ARNm est la conséquence de la diminution de l'expression de SIRT1 (Sirtuin 1, également connue sous le nom de Sirtuin-1, désacétylase des protéines dépendante de la NAD) et du déséquilibre de la phosphorylation et de la méthylation des protéines de liaison à l'ARNm, notamment HuR (antigène humain R) (213). Il en résulte une altération de l'expression des gènes nécessaires au neurodéveloppement et à la neuroplasticité, mais aussi une inhibition de la prolifération et de la différenciation neuronale (210-212). La carence en B₁₂ augmente également l'apoptose neuronale et l'homocystéinylation de protéines impliquées dans la neurodégénérescence, notamment la protéine Tau (214).

Contrairement aux manifestations neurologiques, les manifestations ophtalmologiques sont principalement observées chez les patients dont le diagnostic est réalisé durant la première année de vie (215, 216). Elles sont principalement observées dans les déficits combinés secondaires à une altération du métabolisme intracellulaire de la B₁₂ ou de sa biodisponibilité, mais pas dans le cluster « Mitochondrie ». Ceci suggère que les mécanismes physiopathologiques sous-jacents sont vraisemblablement une conséquence d'une altération de la voie de reméthylation.

Les manifestations cardiovasculaires telles que les évènements thromboemboliques, la cardiomyopathie et l'hypertension artérielle sont les principales manifestations cliniques observées chez les patients après l'âge de 15 ans. Elles étaient sous-estimées dans les revues et registres précédents, qui évaluaient surtout les cas rapportés en pédiatrie (**Table 17**) (203, 204). Les manifestations thromboemboliques sont peu fréquentes au cours de la première année de vie et sont fortement associées à l'âge (**Figure 23**). Elles pourraient être liées à l'augmentation de l'homocystéine. L'absence de résultats des études interventionnelles ayant pour objectif de baisser le taux d'homocystéine dans les cas d'hyperhomocystéinémie légère (<30 µmol/L) ont brouillé le débat concernant la prise en charge des patients présentant une hyperhomocystéinémie intermédiaire à sévère (217). En revanche,

l'association entre vitamine B₁₂ et événements thromboemboliques a récemment été mise en évidence dans une étude portant sur les patients présentant une hyperhomocystéinémie >30 µmol/L, qui étaient hospitalisés pour des manifestations thromboemboliques et autres manifestations cardiovasculaires parmi 1006 patients au C.H.R.U. de Nancy (218). L'hyperhomocystéinémie était liée à une carence en vitamine B₁₂ chez 40 % des patients et des variants génétiques sur un ou plusieurs gènes du métabolisme de la vitamine B₁₂ ont été retrouvés chez 11 % des patients (218).

L'augmentation de la pression artérielle systolique est également étroitement associée à l'âge (**Figure 23**). Elle ne semble pas être expliquée par la survenue d'une insuffisance rénale chronique, cette dernière n'étant pas associée à l'âge. Le lien entre la pression artérielle systolique et le taux d'homocystéine a été documenté dans des études interventionnelles ciblant le gène *MTHFR* et une supplémentation en riboflavine (219, 220). En revanche, l'augmentation de la pression artérielle systolique n'est pas rapportée dans la littérature sur les erreurs innées de la vitamine B₁₂, probablement parce que les séries de cas publiées se concentrent principalement sur les nouveau-nés et les enfants (203). L'augmentation de la pression artérielle est cohérente avec les données expérimentales chez le rat, chez qui une carence en vitamine B₁₂ et en folates pendant la grossesse est associée à une hypertension, un remodelage artériel et une cardiomyopathie. Ces manifestations sont secondaires à une homocystéinylation des protéines de la matrice extracellulaire et une altération des voies angiotensine-AT2 et TGFB1 chez les ratons (221-224).

Des décompensations métaboliques aiguës ont été observées non seulement au cours de la première année de vie, mais également de manière plus tardive, avec un risque associé de décès. Ces résultats illustrent la nécessité d'un suivi des patients à l'âge adulte. Nos données soulignent également la prédominance des décompensations métaboliques aiguës et des décès dans le groupe de gènes fonctionnels « Mitochondrie » (**Table 13**). Cela illustre les conséquences dramatiques de l'altération de la conversion du méthylmalonyl-CoA en propionyl-CoA. Cette réaction est la dernière étape d'une voie anaplerotique cruciale, qui alimente le cycle de Krebs (225). L'observation fréquente de décompensations et de décès chez les patients classés dans le groupe « Mitochondrie » trouve écho chez les souris *Mut^{-/-}*, où la plupart des souris homozygotes ne survivent pas plus de 24 heures (226, 227). Un modèle de souris hémizygote (*Mut-ko/ki*), qui combine une mutation faux-sens

knock-in (ki) avec un allèle knock-out (ko), provoque un retard de croissance et un dysfonctionnement rénal, ce qui correspond à un phénotype léger observé chez les patients adultes (228). L'ajout d'un régime enrichi en protéines entraîne l'apparition d'un phénotype plus sévère avec des anomalies comportementales, cardiovasculaires et hématologiques, suggérant l'influence du régime alimentaire, en particulier sur les cas adultes (229).

Les diagnostics après l'âge de 15 ans ne concernent que 18% de tous les cas et pourraient être liés en partie à la plus faible pathogénicité des variants génétiques (**Table 8**). Parmi les dix variants génétiques les plus fréquents, sept sont annotés comme pathogènes et produisant une protéine tronquée avec des conséquences présumées dramatiques sur le métabolisme de la vitamine B₁₂. Ces variants ont été principalement signalés chez les nouveau-nés (**Table 8**). En revanche, la plupart des cas diagnostiqués après 15 ans présentaient soit la mutation pathogène p.Arg161Gln, soit des mutations missense classées comme « probablement pathogènes ». De même, les patients de plus de 15 ans du groupe « Mitochondrie » présentaient des variants génétiques classés comme « probablement pathogènes » ou de « signification incertaine » sur les gènes *MMUT*, *MMAA* et *MMAB* (**Table 9-11**).

Nous pensons que certains résultats clés de notre étude pourraient avoir un impact sur la pratique clinique. Nous avons montré que les manifestations neurologiques telles que l'hypotonie, les anomalies de l'activité de fond à l'EEG hors événements critiques, la microcéphalie, le nystagmus et le strabisme pouvaient évoquer une maladie héréditaire du métabolisme de la vitamine B₁₂ même en l'absence d'anémie en pratique pédiatrique. En revanche, des troubles de la marche, une neuropathie périphérique, un syndrome extrapyramidal, une dépression et une atrophie cérébrale sont des signes plus fréquemment observés chez les patients après l'âge de 15 ans. Ces patients sont pris en charge par des neurologues ou des médecins internistes qui doivent être sensibilisés au diagnostic de maladies héréditaires du métabolisme de la vitamine B₁₂. Nos résultats montrent également que les manifestations cardiovasculaires sont beaucoup plus fréquentes chez les adultes que chez les enfants. L'association de l'augmentation de la pression artérielle systolique avec l'âge est une manifestation jusqu'ici inconnue dans ce groupe de maladies. Les manifestations thromboemboliques observées en l'absence de facteurs de risque de thrombophilie doivent conduire à rechercher une hyperhomocystéinémie

secondaire à une erreur héréditaire du métabolisme de la vitamine B₁₂, comme cela a été montré très récemment dans une étude observationnelle (218). Ces maladies rares peuvent être sous-estimées, voire ignorées, en médecine cardiovasculaire. Les sociétés américaines et européennes de cardiologie ne recommandent pas d'inclure l'hyperhomocystéinémie comme facteur de risque de maladies cardio-vasculaires. Par conséquent, les cardiologues manquent de connaissances pour diagnostiquer et traiter les patients présentant une hyperhomocystéinémie intermédiaire ou sévère liée à une erreur héréditaire du métabolisme de la vitamine B₁₂. Ces profils cliniques, neurologiques et cardiovasculaires, devraient inciter les cliniciens à doser systématiquement les marqueurs métaboliques du statut en vitamine B₁₂, notamment l'homocystéine et l'acide méthylmalonique, lorsque les étiologies les plus fréquentes sont écartées. Une analyse génétique pourrait être intégrée dans le bilan diagnostique de ces patients, en particulier chez ceux qui présentent des phénotypes cliniques extrêmes et/ou une histoire familiale évocatrice. Dans ce contexte, les approches basées sur le séquençage de l'exome clinique pourraient être utilisées comme une stratégie diagnostique de premier niveau chez les patients pour lesquels un diagnostic de troubles héréditaires du métabolisme de la vitamine B₁₂ est suspecté. L'identification d'une erreur génétique du métabolisme de la vitamine B₁₂ permettrait une approche étiologique et thérapeutique personnalisée pour parvenir à une restauration partielle ou totale des altérations métaboliques, avec des bénéfices potentiels à long terme (218).

Notre méta-analyse présente plusieurs points forts. Tout d'abord, nous rapportons les données individuelles de 824 patients permettant de dessiner le paysage phénotypique des patients atteints de troubles héréditaires du métabolisme de la vitamine B₁₂. Nous avons également recherché des prédicteurs cliniques et biologiques significativement associés à la catégorie d'âge, aux clusters fonctionnels de gènes et au décès. La description de 74 adultes, 133 enfants et 509 nouveau-nés nous a permis de rapporter l'évolution et la spécificité des manifestations selon l'âge du patient. À titre de comparaison, l'étude de registre la plus complète a porté sur 248 patients principalement suivis dans des services pédiatriques (204).

Deuxièmement, les données rapportées couvrent les 15 gènes connus, responsables de troubles héréditaires du métabolisme de la vitamine B₁₂. Ceci a permis d'effectuer une annotation actualisée et une prédiction de pathogénicité sur

plus de 300 variants génétiques rapportés sur les quatre gènes les plus fréquemment observés (*MMACHC*, *MMUT*, *MMAA* et *MMAB*). En comparaison, la plus grande étude de registre n'a rapporté que des patients atteints de déficit de type *cbIC*, *cbIG*, *cbIE*, *cbID* et *cbIJ* (204).

Troisièmement, notre méta-analyse rapporte des cas individuels, nous permettant de compiler des patients non sélectionnés, réduisant ainsi le risque d'hétérogénéité de la population. Nous n'avons pas pris en compte les études de registres et les séries de cas avec des données agrégées afin d'éviter tous biais liés aux modèles d'étude. Cette approche nous a permis de considérer des manifestations non rapportées dans les registres, notamment le nystagmus, la maculopathie, la rétinopathie, la neuropathie périphérique, les troubles de la marche, le syndrome pyramidal, le syndrome extrapyramidal, et l'atrophie cérébrale observée sur IRM (**Table 17**).

Nous reconnaissons plusieurs limites. Premièrement, nous avons utilisé des données extraites de cas cliniques publiés par le biais d'une recherche rétrospective systématique, avec le risque de données manquantes. Par exemple, les résultats de laboratoire n'étaient pas disponibles pour tous les patients.

Deuxièmement, le faible nombre de cas secondaires à un trouble héréditaire de l'absorption de la vitamine B₁₂ n'a pas permis d'évaluer s'ils présentaient un profil clinique distinct. Le nombre de cas était plus faible que prévu au regard d'une étude récente de notre centre de référence pour les maladies métaboliques rares. Celle-ci a montré que les mutations des gènes *GIF*, *AMN* et *CUBN* étaient les principales causes d'hyperhomocystéinémie due à une carence en vitamine B₁₂ (218). En outre, le diagnostic de la maladie d'Imerslund-Gräsbeck est probablement sous-estimé puisque le test de Schilling n'est plus disponible. De même, la détermination du récepteur soluble du facteur intrinsèque dans l'urine a une utilisation limitée malgré sa valeur diagnostique (230-232).

Troisièmement, nous avons rapporté le seul cas de la littérature consécutif à une mutation de *ZNF143* mais pas les cas liés à des mutations des gènes *HCFC1*, *THAP11* et *PRDX1*. Ces gènes ne sont pas directement impliqués dans le métabolisme de la vitamine B₁₂ et leurs mutations produisent des manifestations liées à une expression altérée de la protéine *MMACHC* et/ou d'autres gènes. *HCFC1* est un corégulateur transcriptionnel qui interagit avec les protéines de liaison à l'ADN,

THAP11 et ZNF143, pour réguler conjointement l'expression de gènes cibles qui incluent *MMACHC* (153, 233, 234). Le complexe HCFC1/THAP11 agit également comme un régulateur transcriptionnel de la biogénèse des ribosomes au cours du développement (235). Les mutations de l'un de ces deux gènes produisent une diminution de l'expression du gène *MMACHC* avec des manifestations métaboliques plus légères mais des manifestations neurologiques plus graves que les mutations de *MMACHC*. Certaines mutations peuvent également entraîner des syndromes complexes présentant des aspects à la fois de la maladie *cb/C* et des ribosomopathies. En outre, certains variants de *HCFC1* produisent une déficience intellectuelle liée au chromosome X, même en l'absence d'anomalies métaboliques de la vitamine B₁₂. Le seul cas de la littérature présentant deux mutations dans le gène *ZNF143* présentait une acidémie méthylmalonique associée à une hyperhomocystéinémie, ainsi qu'une fente palatine bilatérale, une microcéphalie, des manifestations neurologiques graves et une communication interventriculaire (234). *PRDX1* est un gène voisin de celui de *MMACHC*. Les mutations sur *PRDX1* sont associées au trouble héréditaire du métabolisme de la vitamine B₁₂ de type épi-*cb/C* (145). Il est dû à une épimutation au niveau du promoteur du gène *MMACHC*, qui résulte de mutations d'épissage de *PRDX1* avec une extension aberrante de la transcription antisens à travers le promoteur *MMACHC* (145). Les transcriptions en lecture antisens englobent également le promoteur du gène voisin *TESK2*, ce qui entraîne l'extinction des deux gènes *MMACHC* et *TESK2* (236). Jusqu'à présent, 20 cas ont été rapportés, avec une fréquence de décompensation métabolique sévère plus élevée que chez les patients présentant des mutations du gène *MMACHC* (237).

La quatrième limite de notre revue systématique est l'exclusion des rapports de cas non anglais, ce qui aurait pu potentiellement conduire à un biais de sélection. Cependant, une étude précédente examinant l'influence des publications non anglaises sur les estimations des méta-analyses n'a pas révélé d'effet significatif (238).

Cinquièmement, nous n'avons pas utilisé de méthodes d'apprentissage automatique qui pourraient représenter un outil intéressant pour réduire la charge manuelle pendant le processus de collecte et d'examen de la littérature. Cependant, ces méthodes sont limitées par leur biais potentiel (239). En outre, les méthodes d'apprentissage automatique ne s'appliquaient pas à certaines publications anciennes sans format numérique qui ont été incluses dans notre revue systématique.

En conclusion, notre méta-analyse et notre étude d'association portant sur la description phénotypique et génétique de 824 patients, avec un trouble héréditaire du métabolisme de la vitamine B₁₂ génétiquement prouvé, ont mis en évidence ces pathologies comme des étiologies potentielles dans l'algorithme diagnostique des manifestations neurologiques atypiques et des troubles thromboemboliques non expliqués par les étiologies classiques, chez l'enfant et l'adulte. Nous avons mis en évidence une fréquence élevée de troubles héréditaires du métabolisme de la vitamine B₁₂ chez les patients de plus de 15 ans. Par rapport aux cas plus jeunes, les adultes avaient moins de mutations pathogènes et présentaient une prévalence plus élevée de manifestations cardiovasculaires, notamment d'évènements thromboemboliques ainsi qu'une augmentation de la pression artérielle. Les manifestations neurologiques dépendaient aussi fortement de l'âge, avec une prédominance dans les groupes de gènes qui altèrent la voie de reméthylation. En revanche, la décompensation métabolique et le décès étaient prédominants dans les groupes de gènes qui altèrent la conversion du méthylmalonyl-CoA en propionyl-CoA, quel que soit l'âge du patient (**Figure 27**).

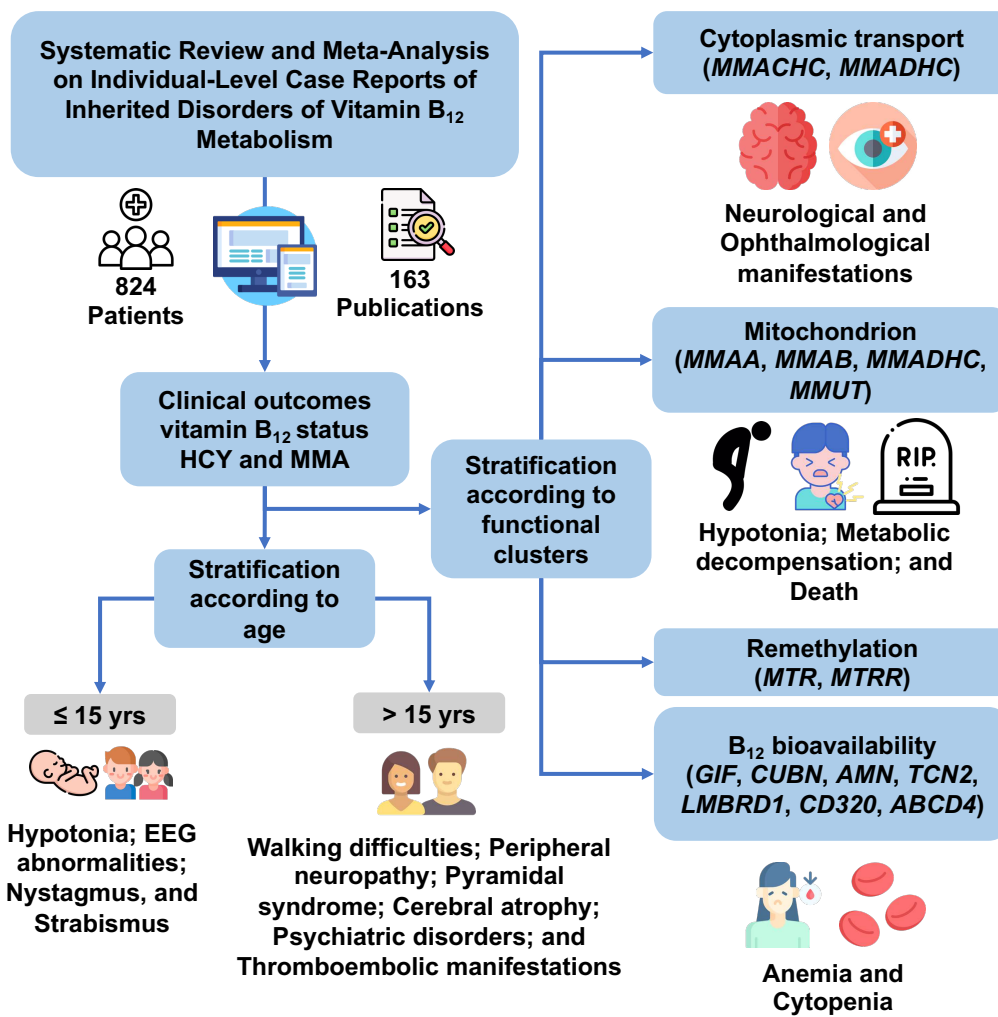


Figure 27. Résumé graphique de l'article

3 Partie 3 : Évaluation d'un panel NGS pour le diagnostic des patients pris en charge au centre de référence pédiatrique des erreurs innées du métabolisme du C.H.R.U. de Nancy

3.1 Préambule

Notre méta-analyse a démontré l'importance de l'accessibilité à une technique de diagnostic génétique à grande échelle, afin de permettre une prise en charge personnalisée. Ceci est aujourd'hui rendu possible par la démocratisation des séquenceurs à haut débit, permettant de séquencer l'ADN d'un individu en un temps court, ouvrant de facto la voie à l'ère de la génétique. Néanmoins, ces techniques doivent être éprouvées en pratique clinique en permettant d'apporter une réponse à un clinicien face à un phénotype clinique et/ou biologique évocateur.

Les deux premières techniques de séquençage d'ADN datent toutes les deux de 1977. Il s'agit de la technique de Maxam-Gilbert (240) et de Sanger (241). La technique de Maxam-Gilbert a rapidement été supplantée par la seconde, notamment du fait de l'utilisation de produits toxiques. La technique de Sanger est donc devenue la référence pour séquencer l'ADN.

3.1.1 Séquençage de nouvelles générations

A partir du milieu des années 2000, nous avons vu apparaître les séquenceurs à très haut débit, ou séquenceurs de nouvelles générations (NGS) (242, 243), capables de réaliser plusieurs millions de réactions en parallèle (244). Le concept de haut débit fait référence au fait qu'un séquenceur de nouvelle génération peut séquencer l'intégralité du génome en quelques heures, là où un séquenceur de Sanger prendrait plus de 19 ans. (245)

3.1.1.1 Technique de séquençage

Le terme « NGS » ne désigne pas une technique unique mais plutôt un ensemble de technologies de séquençage post-Sanger développées au cours des deux dernières décennies. Ces technologies comprennent entre autre le séquençage par synthèse (246), le séquençage par ligature (247) ou encore le séquençage ionique par semi-conducteur (248). La technique la plus utilisée en médecine génétique aujourd'hui est le séquençage par synthèse employé par les appareils Illumina®. Même si le NGS remplace largement le séquençage de Sanger dans le diagnostic moléculaire (249, 250), les deux technologies partagent une origine commune qui remonte à des millions d'années : toutes deux réutilisent la machinerie de réplication de l'ADN. De façon simplifiée, la réplication de l'ADN ne nécessite « que » trois éléments : un brin matrice,

des bases libres et une enzyme (polymérase) qui relie les bases libres, une à la fois, en un nouveau brin complémentaire du brin matrice (251) (**Figure 28**).

L'innovation clé des séquenceurs est l'utilisation de bases modifiées non extensibles et marquées par fluorescence. Dans le séquençage Sanger, seul un faible pourcentage de bases est modifié, alors qu'en NGS, toutes les bases le sont. Dans les deux techniques de séquençage, lorsque la polymérase incorpore une base modifiée, l'extension du nouveau brin s'arrête. Ce brin nouvellement terminé est coloré de manière unique, pour refléter sa base la plus récemment ajoutée. Le principe fondamental pour le séquenceur est d'organiser les molécules de telle sorte que le signal de fluorescence soit interprétable.

Dans le séquençage de Sanger, l'ensemble de molécules d'ADN - toutes issues de la même position sur la matrice mais ayant une taille différente en raison de la terminaison à des positions aléatoires - sont disposées dans un champ électrique, qui les sépare par taille (241). Au fur et à mesure que les molécules migrent, elles passent devant un détecteur qui enregistre la couleur de la fluorescence, produisant une série de pics cartographiée directement sur une séquence d'ADN (**Figure 28**).

Le NGS utilise la séparation positionnelle (251): des millions de brins d'ADN matrice différents se lient à des positions discrètes sur une lame de verre et restent fixés à la même position tout au long de la réaction de séquençage. Chaque brin est ensuite allongé par une seule base modifiée, et un microscope capture une image qui prend en compte à la fois la position et la couleur associée à chaque base. Ensuite, les bases modifiées sont converties en bases régulières, de sorte qu'elles deviennent à la fois extensibles et non fluorescentes. Ce processus de restauration les prépare à subir des cycles ultérieurs d'extension et d'imagerie avec une nouvelle base marquée. Le processus se répète plusieurs fois permettant de couvrir un grand nombre de séquence.

3.1.1.2 Marqueurs qualités

Deux critères fondamentaux sont nécessaires pour l'interprétation des séquençages (252). La profondeur du séquençage, exprimée en nombre de fois (X), correspond au nombre de fois que chaque base ciblée est lue par le séquenceur. On parle de lectures ou « reads ». Pour exemple, une profondeur de 100X signifie que chaque base a été séquencée 100 fois de manière indépendante. Les recommandations de l'European Society of Human Genetic (ESHG) recommandent d'avoir un minimum de 20 reads

pour une base avant de conclure à l'état hétérozygote d'un variant. Le deuxième critère est la couverture. Elle correspond au pourcentage de bases effectivement séquencées par rapport au nombre total de bases ciblées au départ. Elle permet d'évaluer la qualité globale de l'analyse. Par exemple, si une région est couverte à 100% à 40X minimum cela signifie que toutes les bases ont été séquencées au moins 40 fois chacune de manière indépendante.

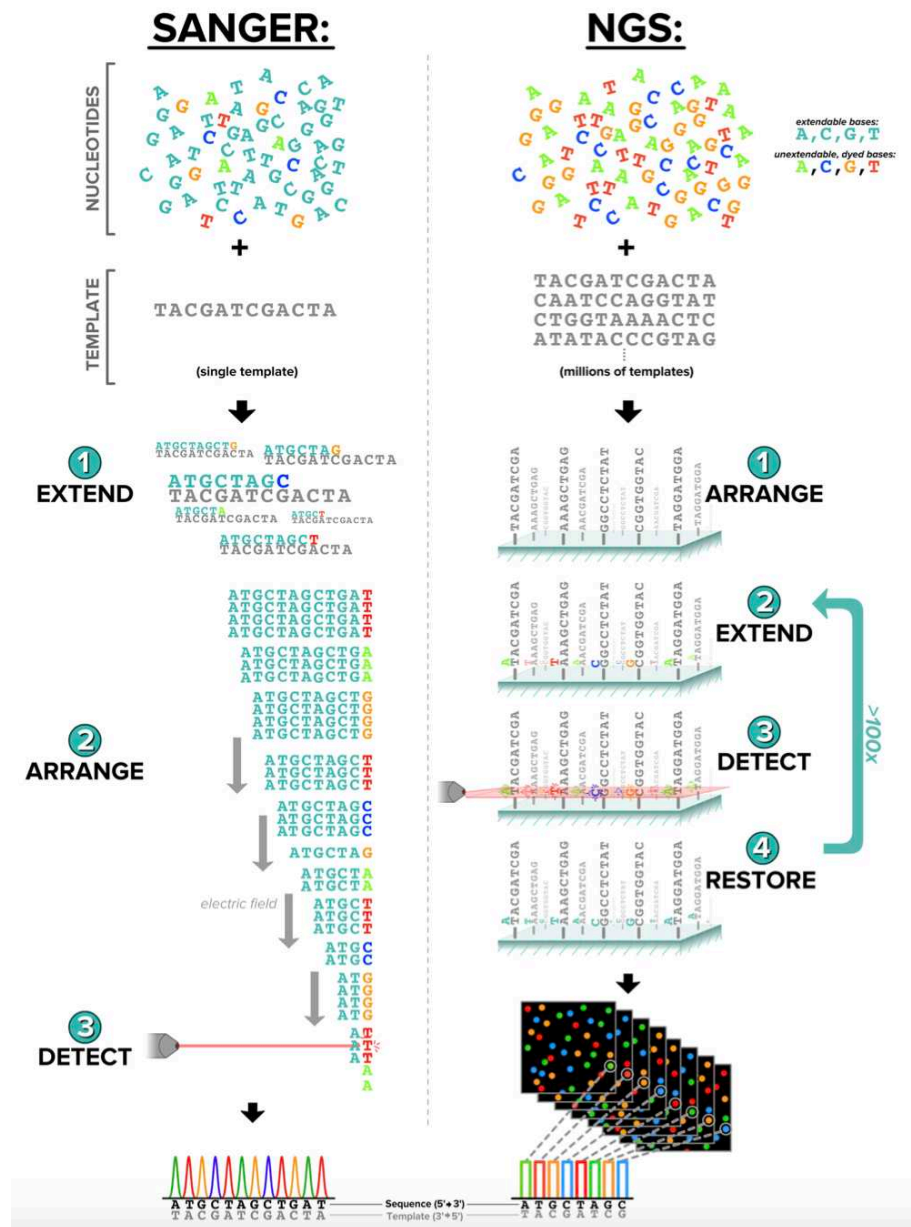


Figure 28. Différences techniques entre le NGS et la technique SANGER (d'après Muzzey and al. Curr Genet Med Rep 2015).

3.1.2 Classification des variants

L'American College of Medical Genetics (ACMG) a publié des recommandations sur la classification de pathogénicité des variants identifiés lors de séquençage génétique (196). Cette classification permet d'harmoniser les rendus de résultats d'un laboratoire à l'autre. Les variants sont répartis en 5 classes, selon leur niveau de pathogénicité :

- Classe 1 : Variant bénin
- Classe 2 : Variant probablement bénin
- Classe 3 : Variant de signification inconnue
- Classe 4 : Variant probablement pathogène
- Classe 5 : Variant pathogène

Un variant de classe 3 – de signification inconnue - ne permet pas de trancher sur son caractère pathogène ou non. Des analyses complémentaires sont à réaliser pour confirmer ou infirmer son implication dans la symptomatologie présentée par le patient.

3.1.3 Applications pratiques du NGS

Les maladies génétiques sont un groupe hétérogène de maladies causées par une modification de la séquence d'ADN d'un individu. L'émergence du NGS a permis une approche simple et peu coûteuse (moins de 1000\$) pour la réalisation d'un panel de gènes ou d'un séquençage complet de l'exome (253). Cette technique a déjà été utilisée dans différentes situations cliniques : identification d'agents pathogènes en cas de pathologies infectieuses (254, 255), pronostic et projets thérapeutiques en oncohématologie (256-258), recherche de pathologies neuromusculaires (259, 260), ou de pathologies épileptiques (261-263), recherche d'étiologie en cas d'hypotonies néonatales (264, 265) investigation en cas d'anomalies métaboliques de type rhabdomyolyse ou hyperammoniémie (266, 267, 268). La rentabilité est très variable allant de 30 à 60% selon les études et le contexte dans lequel elles s'inscrivent (269-271).

3.2 Objectifs de l'étude n°2

La méta-analyse a souligné l'importance de pouvoir diagnostiquer des erreurs innées du métabolisme en cas de profil clinique atypique, notamment neurologique ou cardiovasculaire, et en cas d'anomalies biochimiques évocatrices. La très grande hétérogénéité des manifestations cliniques associées à la disparité de sévérité et de l'âge auquel les signes surviennent rendent le diagnostic de ces pathologies difficiles. L'existence d'une perturbation biochimique est un élément orientant l'analyse génétique, et dont le rendement diagnostique n'était pas ou peu évalué dans le champ des maladies rares du métabolisme jusqu'ici.

3.3 Introduction de l'étude n°2

Les maladies génétiques correspondent à un groupe hétérogène de maladies causées par une modification de la séquence d'ADN d'un individu. Elles sont nombreuses et géographiquement disparates. On estime que 263 à 446 millions de personnes sont touchées dans le monde, ce qui correspond à une prévalence dans la population mondiale de 3,5 à 5,9 % (3). L'émergence du séquençage de nouvelle génération (NGS) a permis une approche diagnostique simple des troubles génétiques par séquençage de l'exome complet (253) ou par les panels de séquençage de l'exome clinique (CES), également appelés « séquençage de l'exome médical » (272-275). Le séquençage de l'exome a amélioré les connaissances génétiques de plusieurs pathologies tels que les maladies métaboliques (276), les pathologies mitochondriales (277, 278), les maladies neurodéveloppementales (279, 280), ou les pathologies neuromusculaires (281, 282).

Les maladies métaboliques sont des pathologies qui perturbent le métabolisme normal des cellules humaines. Des milliers d'enzymes impliquées dans de nombreuses voies métaboliques interdépendantes sont nécessaires au bon fonctionnement de la cellule et de l'organisme. Un défaut de fonctionnement d'une de ces enzymes induit des altérations plus ou moins importantes de l'homéostasie métabolique, qui peuvent être responsable d'une pathologie appartenant au spectre des erreurs innées du métabolisme. Classiquement, les erreurs innées du métabolisme sont sévères dans leur présentation débutant lors durant les premiers mois de la vie. L'identification précise de leur cause moléculaire est essentielle pour une approche thérapeutique et un conseil génétique approprié (283-285).

Dans le présent travail, nous avons évalué le rendement diagnostique du CES en tant que test génétique de premier niveau chez 128 patients consécutifs, d'âge pédiatrique, adressés à un centre de référence du Nord-Est de la France pour une suspicion de maladie génétique, principalement une erreur innée du métabolisme.

3.4 Matériels et méthodes

3.4.1 Cadre français pour le diagnostic et la prise en charge des maladies génétiques

En France, la prise en charge des maladies génétiques est organisée autour de centres de référence spécialisés dans le cadre du « Plan national maladies rares ». Huit centres de référence sont consacrés au diagnostic et à la prise en charge des erreurs innées du métabolisme. L'un de ces centres est situé au C.H.R.U. de Nancy (ORPHA67872) et reçoit les patients adressés par leur médecin traitant lorsqu'une maladie génétique, notamment d'origine métabolique, est suspectée. Les consultations sont menées par un pédiatre sénior spécialisé dans les maladies génétiques et les erreurs innées du métabolisme. Les examens complémentaires sont laissés à la discrétion du pédiatre sénior et peuvent inclure des CES. Les tests génétiques sont effectués après le consentement écrit des parents du cas-index. Dans le cadre du diagnostic des maladies génétiques et des erreurs innées du métabolisme, le CES est pris en charge à 100% par le système de santé français. En France, au moment de l'étude, six maladies faisaient l'objet d'un dépistage néonatal : la phénylcétonurie, le déficit en acyl-CoA déshydrogénase des acides gras à chaîne moyenne (MCAD), l'hyperplasie congénitale des surrénales, l'hypothyroïdie congénitale, la drépanocytose et la mucoviscidose. Les nouveau-nés dont les résultats du dépistage de la phénylcétonurie sont positifs bénéficient d'un test génétique ciblé et ne sont pas évalués à l'aide du CES.

3.4.2 Conception de l'étude et critères de sélection des patients

Nous avons réalisé une étude observationnelle rétrospective sur des patients suivis au centre de référence des erreurs innées du métabolisme du C.H.R.U. de Nancy (France). Les critères d'inclusion étaient les suivants : i) patient d'âge pédiatrique ; ii) suspicion de maladie génétique ; iii) admission à l'hôpital ou consultation au centre de référence des erreurs innées du métabolisme entre janvier 2016 et août 2020.

Les critères d'exclusion étaient les suivants : i) patients avec un diagnostic génétique préalablement confirmé à la date de la première consultation ; ii) patients en attente d'une évaluation métabolique clinique initiale; iii) absence d'exploration génétique requise pour le bilan diagnostique ; iv) CES en cours sans résultat final rendu ; et v) patients suspectés de phénylcétonurie ou d'hyperphénylalaninémie pour

lesquels une approche diagnostique dédiée est disponible via le séquençage de Sanger et/ou un panel ciblé sur le C.H.R.U. de Nancy.

L'étude était non interventionnelle, ce qui signifie que toutes les évaluations cliniques, les analyses biochimiques, les examens d'imagerie et le diagnostic retenu ont été effectués à la discrétion des médecins prenant en charge les patients. Le comité de révision institutionnel de l'hôpital universitaire de Nancy a approuvé l'étude.

3.4.3 Données recueillies pour l'étude

Les données cliniques ont été recueillies par l'examen des dossiers électroniques à l'aide du logiciel DxCare® (Dedalus France, Le Plessis Robinson, France). Pour chaque patient, les données suivantes ont été recueillies : i) données démographiques : âge à la première consultation médicale, sexe ; ii) antécédents médicaux du patient : date de début des symptômes, date de la première consultation ; iii) données relatives au CES : date de prescription du CES, date d'édition du compte-rendu de diagnostic moléculaire établi par le médecin de médecine moléculaire, nombre de variants génétiques retenus dans le diagnostic moléculaire, classification des variants selon les critères de l'ACMG (196), et le statut génotypique des patients dans le rapport de diagnostic moléculaire.

3.4.4 Séquençage de nouvelle génération (NGS)

Nous avons réalisé les CES à l'aide du panel TruSight One sur une plateforme MiSeq d'Illumina (Illumina, Évry, France) ou du panel TruSight One expanded sur une plateforme NextSeq 550 d'Illumina au C.H.R.U. de Nancy et à la Plateforme de Génomique Fonctionnelle de l'unité INSERM UMR_S 1256 (NGERE), comme décrit précédemment (286, 287)

Au département de médecine moléculaire du C.H.R.U. de Nancy et au Centre national de référence des erreurs innées du métabolisme, nous avons opté pour une stratégie basée sur les captures TruSight d'Illumina qui couvrent un grand nombre de gènes au lieu de choisir une approche basée sur l'exome complet. Le TruSight One Sequencing Panel offre une couverture complète de plus de 4800 gènes, tandis que le TruSight One Expanded Sequencing Panel cible environ 1900 gènes supplémentaires présentant des associations récentes avec des maladies dans la littérature scientifique, dont la liste complète est rapportée à la fin de partie III. Nous avons utilisé les solutions d'enrichissement Nextera et Nextera Flex respectivement avec les captures TruSight One et TruSight One Expanded. Les panels TruSight One

Expanded et TruSight One couvrent 100% et 82% (145/176) des 176 gènes nucléaires mitochondriaux. L'analyse bio-informatique a été réalisée comme décrit précédemment (145, 287, 288).

Le logiciel Burrows-Wheeler Aligner (BWA) a été utilisé pour annoter les différentes lectures selon GRCh37/hg19 en utilisant l'algorithme BWA-MEM. Les doublons PCR ont été supprimés des alignements à l'aide de l'outil Picard (MarkDuplicates) (<http://broadinstitute.github.io/picard>). Les indels ont été réalignés à l'aide du Genome Analysis Toolkit (GATK) (289). Les SNV et les indels courts ont été évalués à l'aide du logiciel GATK HaplotypeCaller (289).

Nous avons utilisé la stratégie suivante pour filtrer et prioriser les variants génétiques : **Étape #1** : Importer tous les variants génétiques récupérés ; **Étape #2** : Retenir uniquement les variants de fréquence rare ou faible en excluant les variants dont la fréquence allélique alternative (AAF) rapportée est >5% dans les bases de données suivantes : Le « Exome Aggregation Consortium » (ExAC) et le « Genome Aggregation Database » (gnomAD Exomes). L'objectif de l'étape #2 est de retenir les variants rares (AAF <1%) et de faible fréquence (AAF <5%), compatibles avec le risque de maladie, tels que ceux impliqués dans les maladies monogéniques graves (290); **Étape #3** : Exclusion des variants introniques autres que les variants donneurs d'épissage, accepteurs d'épissage ou régions d'épissage ou les variants synonymes ; **Étape #4** : Hiérarchisation des variants génétiques selon leur association avec le phénotype étudié à l'aide de SVS-PhoRank, basé sur l'algorithme Phevor (290). L'algorithme Phevor annote l'ontologie en fonction de leur proximité avec les phénotypes des patients. Le score SVS-PhoRank a été calculé selon RefSeq Genes 105v2, NCBI, en utilisant les ontologies suivantes : « Human Phenotype Ontology », « Gene Ontology », et « OMIM Phenotype Ontology ». L'annotation des variants fonctionnels a été réalisée à l'aide des outils suivants : MutationTaster (291), Functional Analysis through Hidden Markov Models (FATHMM) (292), MetaSVM / MetaLR scores (293), Sorting Tolerant From Intolerant (SIFT) (294), Protein Variation Effect Analyzer (Provean) (295), et deleterious annotation of genetic variants using neural networks (DANN) (296).

La pathogénicité des variants a été rapportée selon les critères de l'ACMG (196). Tous les variants retenus ont été systématiquement évalués selon ClinVar (198). Tous les variants génétiques retenus dans le rapport de diagnostic moléculaire devaient répondre à des critères métriques de haute qualité (profondeur de lecture

[RD] >20, rapport alt-read [ARR] >0,2, score de qualité du génotype [GQ] de 99). Un séquençage de confirmation Sanger a été effectué dans de rares cas de variants présentant des indicateurs de qualité sous-optimaux (par exemple, variants donneurs ou accepteurs d'épissage, variants homozygotes). Toutes les analyses bio-informatiques, y compris l'algorithme de classement des gènes selon SVS-PhoRank, ont été réalisées à l'aide de SNP & Variation Suite (v8.9.0 ; Golden Helix, Inc., Bozeman, MT, USA).

3.4.5 Classification des patients selon les résultats du séquençage NGS

Nous avons considéré un CES comme contributif s'il permettait de retenir au moins un variant génétique compatible avec le phénotype clinique du patient dans le cadre d'un trouble dominant ou au moins deux variants génétiques compatibles avec le phénotype clinique du patient dans le cadre d'un trouble récessif selon la base de données OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man®) (297).

Nous avons considéré un CES comme non contributif si aucune variant génétique n'a été trouvée compatible avec le phénotype clinique du patient ou si un seul variant génétique a été rapportée dans le cadre d'un trouble récessif.

3.4.6 But de l'étude

L'objectif principal de l'étude était d'évaluer le rendement diagnostique du CES, défini comme la proportion de patients pour lequel un CES était contributif dans l'ensemble de la population. L'objectif secondaire de l'étude était d'évaluer le rendement diagnostique du CES en fonction de cinq sous-groupes de patients : groupe 1 : ostéogénèse imparfaite ; groupe 2 : erreur innée du métabolisme avec des résultats biologiques évocateurs ; groupe 3 : dyslipidémie ; groupe 4 : troubles neurologiques (y compris le retard mental et psychomoteur, la dystonie et les syndromes épileptiques) ; groupe 5 : affections diverses, définies comme des troubles génétiques suspects qui n'ont pas été classés dans l'une des quatre catégories précédentes. Cette classification en cinq sous-groupes était basée sur le recrutement du centre de référence.

3.4.7 Analyses statistiques

Toutes les variables quantitatives sont indiquées sous forme de médiane et d'écart interquartile (IQR, 25e-75e percentile). Les variables catégorielles sont exprimées sous forme de proportions. Nous avons estimé le rendement diagnostique de la CES

en utilisant une analyse en intention de diagnostiquer, en considérant tous les patients qui ont été exploré par CES. Nous avons effectué des analyses de diagramme de Venn en utilisant l'outil de diagramme de Venn (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/>).

3.5 Résultats

3.5.1 Population étudiée

Entre janvier 2016 et août 2020, 338 patients ont été adressés au Centre de référence des erreurs innées du métabolisme du CHU de Nancy. Deux cent dix patients ont été exclus de l'étude pour les raisons suivantes : absence de test génétique nécessaire au bilan diagnostique (n = 127) ; test génétique précédemment réalisé (n = 48) ; patients atteints d'hyperphénylalaninémie (diagnostic réalisé par un panel NGS ciblé de huit gènes ou séquençage Sanger) (n = 35). Au total, 128 patients ont été inclus dans l'étude. L'âge médian était de 6,5 ans (IQR, 2,0-12,0) avec 43% d'hommes (55/128), et la durée médiane de la maladie était de 7 mois (IQR, 1-47).

3.5.2 Résultats du CES sur toute la cohorte (Table 19)

Sur les 128 patients analysés, 70 présentaient un CES contributif, ce qui correspond à un rendement diagnostique en intention de diagnostiquer de 55 % (70/128) avec un délai médian entre le test et le rapport de 5 mois (IQR, 4-7) (Table 19). Au total, 99 variants génétiques ont été retenus chez 82 patients (Table 20).

Parmi ces patients, 66 présentaient au moins un variant génétique classé comme pathogène ou probablement pathogène, ce qui correspond à un rendement du CES de 52 % (Table 21-22 et Figure 29). Lorsque les variants de signification indéterminée étaient pris en compte, l'efficacité du CES était de 63 % (80/128). Compte tenu de la classification ACMG des 99 variants, nous avons étudié la distribution des variants génétiques parmi les 82 patients à l'aide d'un diagramme de Venn (Table 22 et Figure 29). La proportion de patients présentant uniquement des variants pathogènes, probablement pathogènes ou de signification incertaine était respectivement de 28 % (23/82), 46 % (38/82) et 16 % (13/82). Dix pour cent (8/82) des patients présentaient une combinaison de variantes génétiques à pathogénicité variable selon les critères de l'ACMG (Table 22 et Figure 29)

Table 19. Résultats du CES en tant que test génétique de premier niveau chez les 128 patients pédiatriques consécutifs inclus dans l'étude.

	Osteogenesis imperfecta (n = 8)	Pathologie métabolique (n = 39)	Dyslipidémie (n = 26)	Pathologie neurologique (n = 26)	Autres (n = 29)	Total (n = 128)
Données démographiques						
Age (ans) — médiane (IQR, 25 th –75 th)	3.0 (0.5–12.0)	5.0 (1.3–12.0)	9.5 (5.0–11.0)	5.5 (3.0–11.0)	3.0 (0.8–12.0)	6.5 (2.0–12.0)
Genre masculin — n/N (%)	2/8 (25%)	19/39 (49%)	13/26 (50%)	9/26 (35%)	12/29 (41%)	55/128 (43%)
Disease duration (months), median (IQR, 25 th –75 th)	3.0 (1.5–50.5)	7.0 (0.0–55.8)	3.0 (0.0–65.0)	25.0 (9.0–48.0)	4.0 (1.0–21.8)	7.0 (1.0–47.0)
Clinical exome sequencing results						
Diagnostic yield — n/N (%)	6/8 (75%)	25/39 (64%)	21/26 (81%)	10/26 (39%)	8/29 (28%)	70/128 (55%)
Number of variants retained in the molecular diagnosis	8	40	25	10	16	99
ACMG classification — n (%)						
Benign	0 (0%)	4 (10%)	1 (4%)	0 (0%)	1 (6%)	6 (6%)
Likely benign	0 (0%)	0 (0%)	1 (4%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (1%)
Uncertain significance	3 (38%)	5 (13%)	3 (12%)	1 (10%)	7 (44%)	19 (19%)
Likely pathogenic	1 (12%)	17 (43%)	12 (48%)	8 (80%)	8 (50%)	46 (46%)
Pathogenic	4 (50%)	14 (35%)	8 (32%)	1 (10%)	0 (0%)	27 (27%)
Genotype status — n (%)						
Heterozygous	7 (88%)	15 (45%)	25 (100%)	8 (80%)	8 (62%)	63 (71%)
Homozygous	1 (12%)	11 (34%)	0 (0%)	2 (20%)	2 (15%)	16 (18%)
Compound Heterozygous	0 (0%)	7 (21%)	0 (0%)	0 (0%)	3 (23%)	10 (11%)
Test-to-report time (months)* — median (IQR, 25th–75th)	5 (4–7)	5 (4–11)	4 (3–6)	5 (3–6)	6 (4–7)	5 (4–7)

Note. IQR : écart interquartile ; n : nombre d'observations ; N : nombre total de patients ; % : pourcentage ; ACMG : American College of Medical Genetics and Genomics.

* Test-to-report time : délai entre la prescription du CES par le pédiatre et la finalisation du rapport clinique par le médecin de médecine moléculaire.

3.5.3 Rendement diagnostique du CES en fonction des sous-groupes de maladies

3.5.3.1 Groupe 1 : Ostéogenèse imparfaite

Huit patients ont été explorés par un exome clinique pour un diagnostic présumé d'ostéogenèse imparfaite. Parmi eux, 6 CES étaient contributifs (3 patients ont été diagnostiqués avec une ostéogenèse imparfaite de type II [COL1A1], 1 avec une ostéogenèse imparfaite de type I [COL1A1], 1 avec le syndrome de Bruck [PLOD2] et 1 avec une ostéoporose juvénile primaire [LRP5]). Un CES a été non contributif pour un patient souffrant d'une véritable fragilité osseuse. Un patient a été exploré inutilement (bébé secoué). Dans ce sous-groupe, le rendement du CES était de 75 % (6/8) (**Table 19**).

3.5.3.2 Groupe 2 : Maladie métabolique avec résultats biologiques évocateurs

Trente-neuf patients ont été explorés par CES pour une maladie métabolique suspectée avec un phénotype évocateur. Parmi eux, 25 avaient un CES contributif (2 patients ont été diagnostiqués avec un trouble de la biogenèse des peroxyosomes de type IA [PEX1], 2 avec une alcaptonurie [HGD], 1 avec une mucopolysaccharidose de type IV A [GALNS], 1 avec un rachitisme hypophosphatémique [PHEX], 1 cas de trouble congénital de la glycosylation de type Ic [MAGT1], 1 cas de galactosémie de type I [GALT], 3 cas de maladie de Fabry [GLA], 2 cas de syndrome de Leigh, 1 cas de déficit en complexe mitochondrial IV [SURF1], 1 cas d'acidémie propionique [PCCA], 1 cas d'acidurie méthylmalonique et d'homocystinurie de type cblJ [ABCD4], 1 cas de déficit congénital en sucrase-isomaltase [SI], 2 cas d'acidurie méthylmalonique due à un déficit en méthylmalonyl-CoA mutase [MMUT], 1 cas d'encéphalopathie à la glycine [GLDC], 1 avec un déficit en succinique semialdéhyde déshydrogénase [ALDH5A1], 1 avec une acidurie malonique et méthylmalonique combinée [ACSF3], 1 avec un syndrome d'insuffisance hépatique infantile [NBAS], 1 avec le syndrome de MELAS [MTTL1] et 1 avec une aspartylglucosaminurie [AGA]).

Le CES était non contributif chez 14 patients, dont six patients avec un CES inutile (1 patient suspecté de déficit de déshydrogénation d'acyl-CoA multiples sur le profil d'acylcarnitines chez qui le diagnostic de trouble de l'alimentation a été posé plus tard (AFRID) ; 1 dépistage de la maladie de Fabry chez un patient sans aucun

symptôme ; 3 patients avec un bilan biologique et des symptômes qui se sont spontanément corrigés ; 1 patient alléguant de faux symptômes).

Dans le sous-groupe de patients avec des résultats biologiques évocateurs de maladie métabolique, le rendement du CES était de 64 % (25/39) (**Table 19**).

3.5.3.3 Groupe n°3 : Dyslipidémie

Vingt-six patients ont été exploré par CES pour une dyslipidémie. Parmi eux, 21 avaient un CES contributif (17 patients ont été diagnostiqués avec une hypercholestérolémie familiale de type I [LDLR], 2 avec une hypercholestérolémie familiale de type II [APOB], et 2 avec des déficiences en lipoprotéine lipase [LPL]).

Le CES était non contributif chez cinq patients, dont quatre patients présentant un CES non nécessaire (deux patients ont normalisé leur profil lipidique après un régime hypolipidique sans traitement pharmacologique associé, et deux présentaient une hyperlipidémie en association avec une obésité).

Dans le sous-groupe de patients présentant une hyperlipidémie, le rendement des CES était de 81 % (21/26) (**Table 19**).

3.5.3.4 Groupe n° 4 : Troubles neurologiques

Vingt-six patients ont été exploré par un CES pour des troubles neurologiques présumés. Parmi eux, 10 ont présenté un CES contributif (1 patient a été diagnostiqué avec une encéphalopathie épileptique infantile précoce [CDKL5], 1 avec le syndrome de progéria de Hutchinson-Gilford [LMNA], 1 avec la dystrophie musculaire d'Emery-Dreifuss [SYNE1], 1 avec l'ataxie épisodique de type I [KCNA1], 1 cas de syndrome de Johanson-Blizzard (UBR1), 1 cas de paraplégie spastique [KIF1A], 1 cas de neuropathie sensorielle héréditaire de type ID [ATL1], 1 cas de syndrome de Vulto-Van Silfhout-De Vries [DEAF1], 1 cas de retard mental autosomique récessif 46 [NDST1] et 1 cas de Marie de Charcot de type 2A1 [KIF1B]).

Le CES était non contributif chez seize patients, dont trois avec un CES non nécessaire (1 patient avait des crises d'épilepsie avec hypoglycémie dans un contexte d'hyperinsulinisme fonctionnel à l'adolescence avec une résolution totale et spontanée ; 1 patient avec un syndrome de Münchhausen par procuration ; et 1 patient avec un retard psychomoteur qui a récupéré spontanément).

Dans le sous-groupe de patients présentant des troubles neurologiques, le rendement des CES était de 39 % (10/26) (**Table 19**).

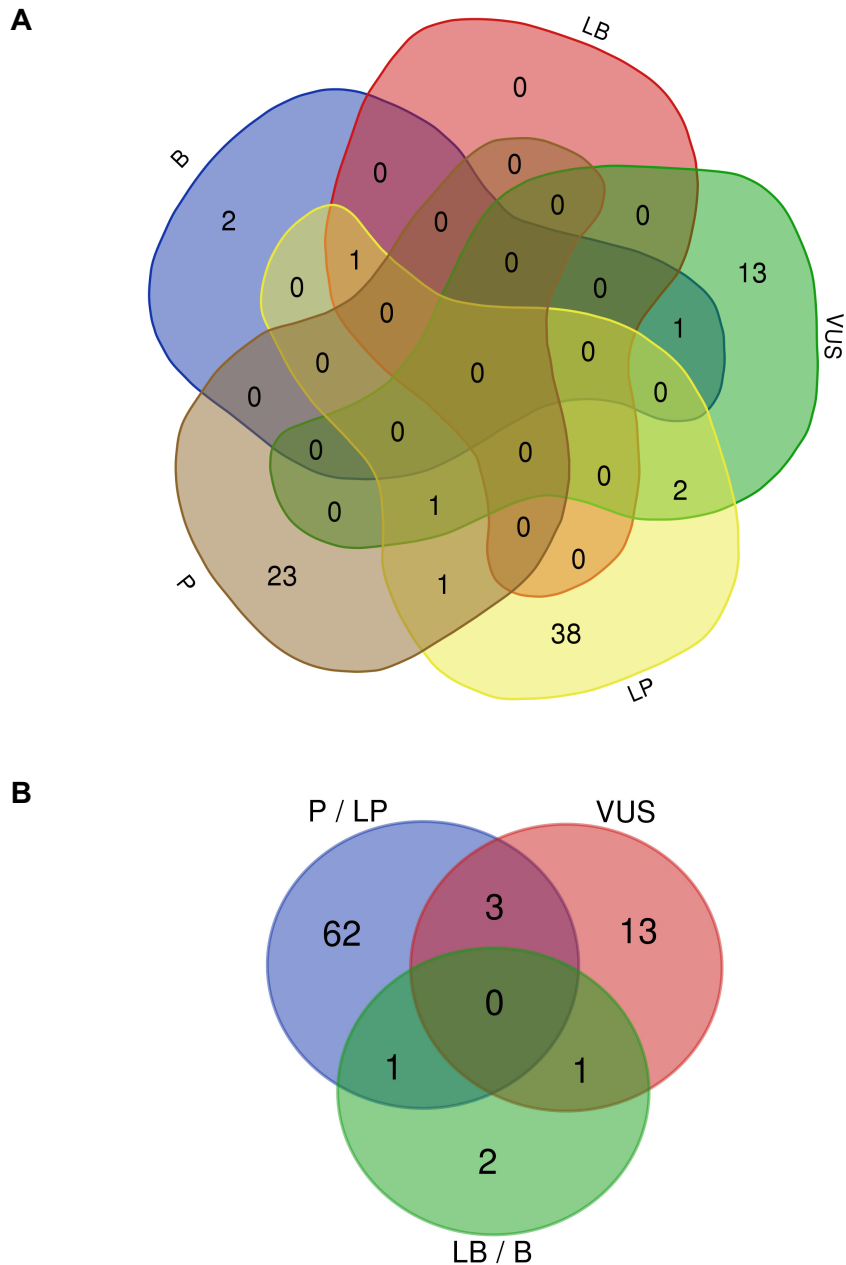
3.5.3.5 Groupe n° 5 : Autres pathologies

Vingt-neuf patients ont été exploré par CES pour une suspicion de trouble génétique non classé dans les quatre sous-groupes mentionnés ci-dessus.

Parmi eux, 8 avaient un CES contributif (2 ont été diagnostiqués avec une susceptibilité à la résistance à l'insuline [PPP1R3A ; HNF1A], 1 patient était atteint du syndrome de Cockayne A [ERCC8], 1 patient était atteint d'une dysplasie arythmogène du ventricule droit [RYR2], 1 patient atteint du syndrome d'urticaire familial au froid [NLRP3], 1 patient atteint d'une maladie inflammatoire de l'intestin [maladie de Crohn] [NOD2], 1 patient atteint du syndrome polyendocrinien auto-immun de type I [AIRE], 1 patient atteint d'un déficit immunitaire).

Le CES était non contributif chez 21 patients, dont quatre avec un CES non nécessaire (1 dépistage familial chez un enfant sain ; 3 patients avec une symptomatologie clinico-biologique qui s'est spontanément normalisée).

Dans ce sous-groupe de patients, le rendement de l'exome clinique était de 28 % (8/29) (**Table 19**).



Supplemental Figure 1

Figure 29. (A) Diagramme de Venn illustrant la distribution des 82 patients présentant au moins un variant génétique retenu dans le rapport de séquençage de l'exome clinique selon les critères de l'ACMG ;
(B) Diagramme de Venn illustrant la distribution des 82 patients selon les sous-groupes suivants : P/LP, VUS, et LB/B. P : Pathogène ; LP : Probablement pathogène ; VUS : Variante de signification incertaine ; LB : Probablement bénigne ; B : Bénigne.

Table 20. Description des 99 variants génétiques obtenus par CES chez les 128 patients pédiatriques inclus dans l'étude.

Gene	Patient ID	Variant selon nomenclature HGVS c.	Statut du génotype	Classification ACMG	Mode de transmission *	OMIM (gène)
<i>LDLR</i>	1	c.400T>C	Heterozygous	Likely pathogenic	AD	606945
<i>APOB</i>	1	c.10913G>A	Heterozygous	Benign	AD	107730
<i>LPL</i>	1	c.1421C>G	Heterozygous	Likely Benign	AD	609708
<i>LEPR</i>	2	c.1205G>A	Heterozygous	Variant of uncertain significance	AD	601007
<i>CC2D2A</i>	3	c.2192delC	Heterozygous	Likely pathogenic	AR	612013
<i>NUBPL</i>	4	c.166 G>A	Heterozygous	Variant of uncertain significance	AR	613621
<i>PEX1</i>	6	c.2282T>C	Homozygous	Pathogenic	AR	602136
<i>LDLR</i>	8	c.2482T>A	Heterozygous	Likely pathogenic	AD	606945
<i>ACADS</i>	9	c.511C>T	Heterozygous	Variant of uncertain significance	AR	606885
<i>HGD</i>	10	c.674G>A ;	Compound heterozygous	Pathogenic	AR	607474
<i>HGD</i>	10	c.175delA	Compound heterozygous	Pathogenic	AR	607474
<i>CDKL5</i>	11	c.584G>C	Heterozygous	Likely pathogenic	XLD	300203
<i>CPT1A</i>	12	c.454A>G	Heterozygous	Variant of uncertain significance	AR	600528
<i>LMNA</i>	14	c.1600A>G	Heterozygous	Likely pathogenic	AD	150330
<i>SYNE1</i>	15	c.19163C>T	Heterozygous	Likely pathogenic	AD	608441
<i>ERCC8</i>	18	c.300C>G	Homozygous	Pathogenic	AR	609412
<i>POLG</i>	20	c.3708G>T	Homozygous	Variant of uncertain significance	AR	174763
<i>GALNS</i>	22	c.1175G>A	Homozygous	Pathogenic	AR	612222

GCDH	24	c.680G>C	Heterozygous	Likely pathogenic	AR	608801
COL1A1	26	c.2453delG	Heterozygous	Pathogenic	AR	120150
COL1A1	27	c.1532delG	Heterozygous	Pathogenic	AD	120150
PHEX	28	c.914T>C	Heterozygous	Likely pathogenic	XLD	300550
COL6A3	29	c.8636C>T	Heterozygous	Variant of uncertain significance	AR	120250
LDLR	32	c.2482T>A	Heterozygous	Likely pathogenic	AD	606945
MAGT1	33	c.440A>G	Heterozygous	Pathogenic	XLR	300715
DEAF1	34	c.709C>T	Heterozygous	Likely pathogenic	AD	602635
GALT	35	c.1073dupT ;	Compound heterozygous	Pathogenic	AR	606999
GALT	35	c.563A>G	Compound heterozygous	Likely Pathogenic	AR	606999
LDLR	36	c.97C>T	Heterozygous	Pathogenic	AD	606945
LDLR	37	c.97C>T	Heterozygous	Pathogenic	AD	606945
LDLR	38	c.97C>T	Heterozygous	Pathogenic	AD	606945
GLA	39	c.548-2A>G	Heterozygous	Likely pathogenic	XL	300644
GLA	41	c.548-2A>G	Heterozygous	Likely pathogenic	XL	300644
GLA	42	c.548-2A>G	Heterozygous	Likely pathogenic	XL	300644
PPP1R3A	44	c.2267C>T	Heterozygous	Pathogenic	AD	600917
RYR2	45	c.10517G>A	Heterozygous	Variant of uncertain significance	AD	180902
APOB	51	c.10579C>T	Heterozygous	Pathogenic	AD	107730
LPL	54	c.953A>G	Heterozygous	Likely pathogenic	AD	609708
AMPD1	56	c.959A>T	Heterozygous	Variant of uncertain significance	AR	102770
POLG	58	c.3708G>T ;	Compound heterozygous	Benign	AR	174763

POLG	58	c.156_158dupGCA	Compound heterozygous	Benign	AR	174763
LDLR	59	c.875dupT	Heterozygous	Pathogenic	AD	606945
PAH	61	c.782G>A	Heterozygous	Variant of uncertain significance	AR	612349
PLOD2	62	c.382A>G	Homozygous	Likely pathogenic	AR	601865
LSS	63	c.1076+2T>C	Homozygous	Variant of uncertain significance	AR	600909
LDLR	64	c.2476C>T	Heterozygous	Likely pathogenic	AD	606945
APOB	64	c.8198T>C	Heterozygous	Variant of uncertain significance	AD	107730
FMO3	65	c.769G>A	Heterozygous	Benign	AR	136132
PCCA	71	c.231+1G>C	Homozygous	Likely pathogenic	AR	232000
ABCD4	72	c.751C>T	Heterozygous	Likely pathogenic	AR	603214
SI	77	c.4692+62T>C	Homozygous	Likely pathogenic	AR	609845
KCNA1	78	c.676A>G	Heterozygous	Likely pathogenic	AD	176260
HNF1A	80	c.52G>T	Heterozygous	Likely pathogenic	AD	142410
LDLR	81	c.68-2A>T	Heterozygous	Likely pathogenic	AD	606945
HGD	82	c.595T>C	Homozygous	Likely pathogenic	AR	607474
MMUT	83	c.2026G>A	Compound heterozygous	Likely pathogenic	AR	609058
MMUT	83	c.1352A>G	Compound heterozygous	Likely pathogenic	AR	609058
GLDC	84	c.1687A>G	Compound heterozygous	Likely pathogenic	AR	238300
GLDC	84	c.512G>A	Compound heterozygous	Likely pathogenic	AR	238300
MMUT	84	c.655A>T	Compound heterozygous	Pathogenic	AR	609058

MMUT	84	c.1125G>A	Compound heterozygous	Variant of uncertain significance	AR	609058
LDLR	85	c.2476C>T-	Heterozygous	Likely pathogenic	AD	606945
APOB	85	c.8198T>C	Heterozygous	Variant of uncertain significance	AD	107730
COL5A2	86	c.2711C>T	Heterozygous	Variant of uncertain significance	AD	120190
PLOD2	86	c.382A>G	Heterozygous	Variant of uncertain significance	AR	601865
NLRP3	87	c.2113C>A	Homozygous	Likely pathogenic	AD	606416
LDLR	88	c.11G>A	Heterozygous	Pathogenic	AD	606945
NDST1	90	c.1831G>A	Homozygous	Pathogenic	AR	600853
COL1A1	91	c.3421C>T	Heterozygous	Pathogenic	AD	120150
NOD2	92	c.2104C>T	Compound heterozygous	Likely pathogenic	MU	605956
NOD2	92	c.3019dupC	Compound heterozygous	Likely pathogenic	MU	605956
ALDH5A1	93	c.1265G>A	Homozygous	Likely pathogenic	AR	610045
LDLR	94	c.2311+1G>T	Heterozygous	Likely pathogenic	AD	606945
PEX13	95	c.599G>A	Heterozygous	Variant of uncertain significance	AR	601789
DYNC2H1	96	c.7121T>C	Compound heterozygous	Variant of uncertain significance	AR	603297
DYNC2H1	96	c.9044A>G	Compound heterozygous	Variant of uncertain significance	AR	603297
ZNF469	96	c.7424c>A	Compound heterozygous	Benign	AR	612078
ZNF469	96	c.8246A>T	Compound heterozygous	Benign	AR	612078

ATL1	97	c.1010A>T	Heterozygous	Likely pathogenic	AD	606439
MMUT	98	c.1207C>T	Homozygous	Pathogenic	AR	609058
SURF1	99	c.866G>A	Homozygous	Pathogenic	AR	185620
LDLR	101	c.137G>C	Heterozygous	Likely pathogenic	AD	606945
UBR1	102	c.2140A>T	Homozygous	Likely pathogenic	AR	605981
ACSF3	103	c.1075G>A	Heterozygous	Likely pathogenic	AD	614245
LRP5	104	c.1999G>A	Heterozygous	Variant of uncertain significance	AD	603506
KIF1B	105	c.293A>T	Heterozygous	Likely pathogenic	AD	605995
LDLR	106	c.875dupT	Heterozygous	Pathogenic	AD	606945
LDLR	107	c.68-2A>T	Heterozygous	Likely pathogenic	AD	606945
LDLR	108	c.99A>G	Heterozygous	Likely pathogenic	AD	606945
MT-TL1	109	c.3243A>G	Heterozygous	Pathogenic	AD	590050
COL1A1	110	c.2453delG	Heterozygous	Pathogenic	AD	120150
LDLR	111	c.-172G>A	Heterozygous	Pathogenic	AD	606945
LDLR	113	c.11G>A	Heterozygous	Likely pathogenic	AD	606945
KIF1A	115	c.1394+2T>A	Heterozygous	Likely pathogenic	AD	601255
NBAS	116	c.2809c>G	Compound heterozygous	Pathogenic	AR	608025
NBAS	116	c.6278G>T	Compound heterozygous	Pathogenic	AR	608025
AGA	100	c.163C>T	Homozygous	Likely pathogenic	AR	613228
MEFV	119	c.2282G>A	Heterozygous	Likely pathogenic	AR	608107
AIRE	120	c.1A>G	Heterozygous	Likely pathogenic	AD	607358

* According to the Online Mendelian Inheritance in Man database (<https://www.omim.org/>).

Note. AD : autosomique dominant ; AR : autosomique récessif ; XLD : dominant lié à l'X ; XLR : récessif lié à l'X ; XL : lié à l'X ; MU : multifactoriel ; HGVS : Human Genome Variation Society.

Table 21. Efficacité du séquençage de l'exome clinique selon les critères de l'ACMG.

	Nombre de variants	Nombre de patients ayant au moins un variant de type*	Rentabilité du CES dans l'ensemble de la population (n=128)†
Classification ACMG			
P	27	25	20%
LP	46	43	34%
VUS	19	17	13%
LB	1	1	1%
B	6	4	3%
Association des classifications ACMG			
P or LP	73	66	52%
P or LP or VUS	92	80	63%
LB or B	7	4	3%

Note. B : Bénin ; LB : Vraisemblablement bénin ; VUS : Variant de signification incertaine ; LP : Probablement pathogène ; P : Pathogène.

* Cinq patients présentant des variantes pathogènes ou probablement pathogènes présentaient également des variantes appartenant à d'autres catégories de l'ACMG ; trois patients présentaient des variantes B avec ou sans VUS. Les détails sont disponibles dans la **Table 22**.

† L'efficacité de la CES dans l'ensemble de la population a été calculée en divisant le nombre de patients de chaque catégorie par le nombre total de patients inclus dans l'étude.

Table 22. Distribution des 82 patients présentant au moins une variante génétique retenue par CES selon les critères de l'ACMG.

Groupe de patients*	Nombre de patients	Patients ID
LP uniquement	38	32, 71, 102, 80, 119, 72, 108, 115, 92, 103, 113, 11, 78, 107, 87, 93, 77, 39, 97, 41, 15, 81, 101, 62, 54, 100, 82, 28, 120, 83, 14, 24, 42, 105, 3, 94, 8, 34
P uniquement	23	33, 90, 26, 99, 18, 44, 27, 109, 10, 91, 106, 116, 88, 110, 59, 22, 6, 36, 111, 51, 38, 98, 37
VUS uniquement	13	63, 95, 61, 20, 29, 12, 56, 45, 86, 2, 104, 9, 4
LP et VUS	2	64, 85
B uniquement	2	65, 58
P et LP	1	35
P et LP et VUS	1	84
LP et LB et B	1	1
VUS et B	1	96
Nombre total de patient	82	

Note. B : Bénin ; LB : Vraisemblablement bénin ; VUS : Variant de signification incertaine ; LP : Probablement pathogène ; P : Pathogène.

* Les patients ont été classés selon la classification ACMG des variants génétiques retenus dans le compte rendu du CES. Un patient avec deux variantes présentant la même classification AMCG a été compté une fois.

3.6 Discussion

Nous rapportons un rendement diagnostique de l'exome clinique de 55% au sein d'une population pédiatrique d'un centre de référence de 128 patients consécutifs explorés par CES comme test génétique de premier niveau pour une maladie génétique suspectée. Selon les cinq sous-groupes identifiés, le rendement diagnostique de la CES était de 28 % lors d'absence d'éléments biologiques évocateurs et atteignait 81 % chez les enfants atteints de dyslipidémie. Nos résultats démontrent l'utilité du CES en tant qu'outil simple pour établir un diagnostic moléculaire chez les patients pédiatriques présentant une suspicion de trouble génétique avec un délai médian de 5 mois entre le prélèvement et le rapport.

Dans l'analyse bio-informatique des CES, nous rapportons une approche combinée basée sur plusieurs stratégies. Nous associons notamment la méthode classique de filtrage et d'annotation des variants et l'utilisation systématique d'un algorithme axé sur le phénotype pour hiérarchiser les variants. Dans le cadre de notre stratégie axée sur le phénotype, nous avons utilisé l'outil de classement des gènes SVS-PhoRank basé sur l'algorithme Phevor (290), qui s'est avéré améliorer la précision du diagnostic pour les patients présentant un phénotype de maladie typique et ceux présentant des présentations atypiques de la maladie (290).

Le séquençage de l'exome et du génome entier a été évalué dans le diagnostic des maladies génétiques avec une efficacité de diagnostic moléculaire allant de 10 à 51%, selon le contexte (272, 278, 298-310). Dans une cohorte de plus de 3000 patients atteints de maladies rénales chroniques, le séquençage de l'exome a permis un diagnostic génétique dans 10% des cas (301). Chez 814 patients pour lesquelles une pathologie génétique était suspecté, le taux de diagnostic positif d'un CES était de 26 % (272). Dans une série de 127 foetus présentant une anasarque inexplicée, le CES a permis d'identifier un variant génétique dans 29 % des cas (298). Chez 108 patients pédiatriques gravement malades présentant une pathologie monogénique présumée en Australie, le séquençage de l'exome a eu un rendement diagnostique de 51 % (299). Ces données démontrent un meilleur rendement diagnostique du CES dans les populations pédiatriques par rapport aux populations adultes.

Nos résultats sont conformes aux données de la littérature et confirment la meilleure performance de la CES chez les enfants dont le tableau clinique suggère un diagnostic spécifique (par exemple, hyperlipémie, ostéogenèse imparfaite, maladie métabolique) par rapport à ceux dont les caractéristiques cliniques ne sont pas

évocatrices d'un syndrome ou d'un trouble spécifique. En effet, le rendement diagnostique des CES dans les troubles neurologiques pédiatriques est entre 30 et 40 % (266, 311, 312), alors qu'il était plus élevé chez les patients atteints d'ostéogenèse imparfaite (~ 96 %) (313) ou ceux présentant une suspicion de troubles métaboliques ou d'affections monogéniques avec une présentation aiguë dans la petite enfance (~ 50 à 80 %) (299, 314). Il convient de noter que dans l'étude de Yubero et al. le rendement diagnostique était plus élevé chez les patients présentant des signes cliniques et/ou biochimiques spécifiques par rapport à ceux n'en présentant pas (78 % contre 16 %, respectivement) (314).

Les enfants atteints de maladies rares souffrent souvent d'une errance diagnostique pendant plusieurs années avant qu'un test génétique ne soit indiqué. Le CES permet un diagnostic efficace et rapide chez ces enfants, à condition que le phénotype du patient soit soigneusement documenté. Ainsi, une interaction étroite entre le pédiatre et le spécialiste de médecine moléculaire est cruciale pour optimiser les indications du CES et discuter de la pertinence des variants mis en évidence, notamment ceux dont la signification est incertaine.

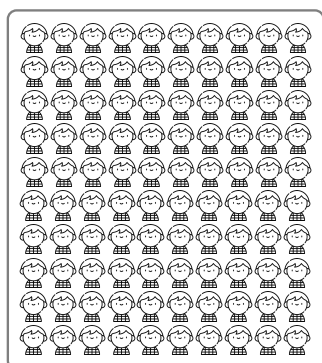
Nous reconnaissons plusieurs limites potentielles de l'étude qui doivent être prises en compte dans l'interprétation de nos résultats. Premièrement, nous rapportons les résultats d'une étude monocentrique qui doivent être confirmés dans des cohortes indépendantes. Deuxièmement, les rendements diagnostiques du CES que nous rapportons dans notre étude peuvent être sujets à un biais vers un rendement diagnostique accru car la sélection des patients explorés a été faite par des pédiatres qui ont une expertise dans le domaine des maladies métaboliques héréditaires. Troisièmement, étant donné l'évolution constante des connaissances sur les annotations des gènes et des variants, les CES non contributifs pourraient à l'avenir révéler des variants pathogènes non encore connus. Quatrièmement, l'efficacité des CES est sous-optimale pour détecter les mutations introniques (CNV). Dans ce contexte, le séquençage du génome entier a présenté un meilleur rendement diagnostique par rapport aux panels de séquençage de gènes ciblés, notamment en mettant en évidence des variants non détectables avec le séquençage de l'exome entier (315).

Notre étude présente plusieurs points forts. Premièrement, nous rapportons l'une des plus vastes séries pédiatriques évaluant le rendement diagnostique d'un

exome clinique. Deuxièmement, nous rapportons des résultats d'exome clinique avec un délai médian de 5 mois entre le test et le résultat, ce qui était compatible avec des soins efficaces. Troisièmement, dans notre pipeline d'analyse bioinformatique, nous avons systématiquement combiné les méthodes classiques de filtrage et d'annotation des variants avec l'algorithme de calcul SVS-PhoRank axé sur le phénotype, conformément à notre stratégie de diagnostic moléculaire.

En conclusion, dans cette série de 128 patients pédiatriques consécutifs présentant une suspicion de troubles génétiques, notre étude démontre l'utilité d'un diagnostic basé sur le CES comme test génétique de premier niveau avec un délai médian de 5 mois entre la prescription et le résultat (**Figure 30**). Notre étude souligne l'importance d'une interaction étroite entre le pédiatre spécialisé et le médecin de médecine moléculaire pour optimiser à la fois l'indication et l'interprétation du CES. En outre, nous avons montré qu'un phénotypage complet des patients améliore la performance diagnostique de l'exome clinique.

Suspected genetic disorder, mainly an inborn error of metabolism between January 2016 and August 2020



Age: 6.5 years (IQR, 2.0–12.0)
Males: 43% (55/128)
Disease duration: 7 months (IQR, 1–47)

National Reference Center for Inborn Errors of Metabolism –
Department of Molecular Medicine

Clinical Exome Sequencing (CES)

French National Plan for Rare Diseases

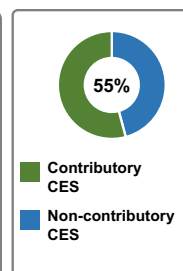


Test-to-report time
Median = 5 months
(IQR, 4–7)

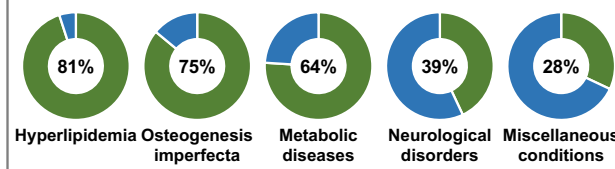
CES Diagnostic Yield (whole population)



Contributory CES
Non-contributory CES



CES Diagnostic Yield (subgroups)



Graphical Abstract

Figure 30. Abstract graphique. Rendement diagnostique du séquençage clinique de l'exome (CES) comme test génétique de premier niveau pour le diagnostic des maladies génétiques chez 128 patients pédiatriques consécutifs adressés à un centre de référence du Nord-Est de la France pour une suspicion de maladie génétique, principalement une erreur innée du métabolisme entre janvier 2016 et août 2020. Les rendements diagnostiques du CES sont rapportés dans l'ensemble de la population et dans les sous-groupes de patients (hyperlipidémie, ostéogénèse imparfaite, maladies métaboliques, troubles neurologiques, conditions diverses) (Icônes réalisées par Flaticon, flaticon.com ; CC-BY-3.0).

Liste des gènes inclus dans les panels TruSight expanded et TruSight one et leur chevauchement avec les gènes nucléaires mitochondriaux.

Panels	Total	Detailed list of genes
Mitochondrial genes* AND TruSight expanded† AND TruSight one‡	143	<p><i>NDUFS6, ABCB7, SLC25A3, COX15, DGUOK, COQ9, NDUFS4, ELAC2, POLG, PDP1, COX10, L2HGDH, ACO2, OPA3, ETFA, ISCU, FOXRED1, NDUFAF1, UQCRQ, TUFM, AUH, NDUFV2, FARS2, TK2, NDUFB3, FH, SLC25A4, D2HGDH, TMEM126A, TAZ, MTO1, PDHX, PANK2, NDUFA12, BOLA3, HARS2, MARS2, TSFM, NDUFS3, NFU1, TYMP, DARS2, AIFM1, POLG2, ACACA, YARS2, NDUFAF6, COA5, PUS1, OXCT1, EARS2, NDUFS2, UQCRB, AMPD1, AGK, LRPPRC, COX4I2, SUCLG1, COQ6, MRPL3, COX6B1, NUBPL, HIBCH, SURF1, PC, SLC25A19, TIMM44, RRM2B, NDUFA9, SLC25A12, DLAT, LARS2, ATP5E, PDHB, ATPAF2, GARS, PNKD, NDUFB9, PDHA1, NDUFS1, NDUFAF4, ALDH3A2, PCK2, NDUFA2, FXN, OPA1, C12orf65, PDSS1, RARS2, BCS1L, APTX, FASTKD2, SDHAF1, GCDH, TIMM8A, TTC19, LIAS, TMEM70, AASS, NDUFV1, XPNPEP3, NDUFA1, MRPS16, MPV17, GFER, SCO2, ETFB, COQ4, DNM1L, SCO1, NDUFAF3, COX14, SARS2, NDUFA11, AFG3L2, NDUFS8, IDH2, SLC19A3, MTFMT, CHAT, GFM1, MRPS22, GAMT, TWNK, MTPAP, AARS2, SACS, ACAD9, ETFDH, NDUFAF2, ETHE1, TPK1, ABAT, NDUFAF5, DLD, TACO1, PDSS2, NDUFA10, SUCLA2, NDUFS7, COQ2, TRMU, DNAJC19</i></p>
TruSight expanded† AND TruSight one‡	4590	<p><i>CLMP, C5orf42, SLC18A1, RPS17, MMP2, CD44, ABCA3, TMEM216, PAX7, KCNMA1, A4GNT, ZHX3, ERCC5, MEFV, XDH, GCSH, EDN1, CYP11A1, ABCC6, STOX1, DECR1, CXCR4, SALL1, NCF4, NAGPA, HYMAI, IRAK1, CFHR5, LMAN1, LDB3, IFT122, GALNT3, CHD8, SUMO1, GP1BA, NTRK1, LRRC6, ANGPTL5, SLC6A11, TOP1MT, MYO9B, CNGB1, MMP7, EP300, GPSM2, TBX10, PRKCG, NOS2, TRIB3, DTNBP1, DDX5, SLC26A1, COL4A5, ZEB1, SOD2, CCDC28B, MSRB3, KCNK6, XK, MET, BANK1, ADAM7, MAX, TNS3, NR4A2, MED13L, EVC, TEAD1, SORL1, NFIA, SYN3, LEP, UBA1, SLC22A2, DMC1, SERPINF1, TP53AIP1, ATXN10, NMNAT1, HMX1, DIP2A, CCL22, LHB, PTPN22, CYP2F1, ITGA3, RABGGTA, BRCA1, SLC26A10, CYP2D6, CRYGC, RUNX3, EFN1, PRKCB, LIPN, ACSM3, A2M, SLCO2B1, LMNB2, ABCD4, ROCK2, BBS12, VKORC1, ELANE, TEK, TRPM6, UGT2B7, FEV, COL1A1, SLC8A1, PDCD5, GRK5, CLDN16, AP1S2, ISL1, NUDT1, GRK1, PRDM2, CD1A, FOXP3, SMYD3, SELL, WDR45, NEIL1, ANO5, LTBP4, GFPT2, RBM10, PYY, ARHGEF9, GPR55, MFF, RAD23B, HIST3H3, PCDHA13, FOXE1, CNGA3, CD38, NAT8L, NEFH, MFSD8, ALX1, ROR2, GSTA2, SMUG1, ZNF385B, MAOA, APOE, TNNT3, GYPC, NR2E3, RFXAP, C6orf15, ALG2, PLEKHG4, TPM3, EPB42, HSPD1, PIWIL3, F2RL1, PRY, NTHL1, OPHN1, TRAPPC9, ADH5, SHBG, KIAA0100, MYH6, LIM2, BCHE, GCLM, SLC24A5, BCL2, HCRTR2, HBZ, ARL13B, CAMTA1, ORC1, DRD3, AIPL1, SNX19, NME8, CHFR, THADA, PIK3CB, COL18A1, PXDN, TNXB, A4GALT, CARD8, FUS, EMX2, TOX3, TF, RSR1, COG1, THRB, MYBPC1, NPR1, MTMR14, DNAH11, ASS1, AQP2, ALAD, SLC9A9, GSTM4, F7, RSPH4A, TFR2, RAG1, IRS1, SRP72, TSPAN7, POMT1, MFN2, LRRC8A, CYP1A1, ATR, THAP1, GBGT1, GRIK2, PCDH18, GNRHR, CHST6, DPYD, HTR3A, POF1B, MAPK10, COX7A2, QKI, KDM6A, NCAM1, MAN2B1, OFD1, ACADL, FERMT3, ABHD12, AGT, SLC22A14, GLIS2, CGA, PEX16, FGF1, IL6R, CHRM1, CHRNB2, UBN2, COL7A1, SEZ6, DBH, TFAP2B, CIITA, MUTYH, FANCC, RP9, NQO2, CDH8, AGPS, NEU1, PCCB, UNG, SPRY2, PRSS56, LZTFL1, XPC, KLHL7, GSTP1, CCR3, SLC9A3R1, HBG2, ASAH1, ADRA1A, ZNF350, PTPN2, GIPR, MIR206, BST1, AH11, SLC3A1, KISS1R, GORAB, GFI1, FHL1, GATA1, LPIN3, AHR, MYLK2, MAD2L1, PRPF3, ATP10A, CHMP2B, TAS2R3,</i></p>

NFE2L2, IL23R, SPINK5, CYP4A22, UNC5CL, KLKB1, HP, BTK, SYTL5, PRND, PIGL, IDS, HS1BP3, CLCA1, UIMC1, FXYD2, ZCCHC12, ATP7B, TRB, DCX, TBX21, PPARGC1A, KCNJ6, CASP5, OTOA, AHRR, POLRMT, NDUFA13, CYP19A1, CD151, ZAN, CRYBA1, NPFFR2, HRH2, SOX9, CYP3A5, CUL4B, CENPJ, PITX1, RDX, CARD9, SLC34A3, CATSPER1, OAS1, CHRN1, ADCY3, DCTN1, LIN28B, CDY2A, ERMAP, GRIP1, APBA2, MUC2, TCF21, JPH2, AMELX, C5, SLC2A10, ANKRD26, ATP2B2, TCP1, SEPT12, CMA1, HCRTR1, PAWR, TLK1, LDLR, ASTN2, ELAVL2, TAB2, SIX2, GPATCH8, HPS1, FAM161A, PGM1, SNCAIP, KCTD13, HLA-DOA, CSMD3, RCAN1, IRF7, UGT1A8, PECR, FAM120A, SHH, SH2B1, THPO, TYRP1, CD177, JAK2, TMPRSS4, TSHZ1, BICD1, TNFRSF1A, AKAP2, USP9Y, CASP1, CD8A, ACADVL, GTF2H5, MYCL, MIR17HG, TNNT2, PLA2G4C, ABCG8, PHGDH, JRK, XIAP, GPC1, APOA2, KALRN, VAX1, IFNAR1, ATP6V0A2, SLC29A3, TALDO1, SDHD, USH2A, SUMF1, B2M, NF1, MIRLET7E, IMPAD1, OLR1, NEGR1, EHD2, NCF1, SPG7, AGER, CBS, MICA, GPR33, SNTA1, IL20RA, ELF4, CACNG2, TLR5, H2BFWT, KCNV2, CLPS, BTBD9, NT5E, NCSTN, GALNT9, NPY, IL18, GCGR, SLC16A2, NOTCH2, ADD1, KDM6B, CLEC4M, MGP, SOST, GYPA, ALCY, CYP4F12, KIAA0232, FKBP5, SMS, ERCC8, PARD6A, GPX4, GCH1, TYMS, SCNN1B, ZNF750, MCM5, ALG9, CSNK2A2, CPA4, MEGF11, CUL3, KRT74, SNCA, ITK, ESRRB, PRCD, HRAS, RABL6, MAP2K4, ITGB2, CD72, TEK2, CDKN2B, ZNF480, PROS1, PSMB8, MAP6, XRCC1, VEGFA, LAMA1, APOL1, SETBP1, ZBTB41, ITGA2, MME, SHANK3, GRIN2A, MAST4, EEF2K, CCDC14, COG8, MYC, NRXN1, ASIC3, ARSA, SUPT16H, PHYH, SOCS3, UNKL, CCNA2, IL10RB, ARID1B, WNT10B, IL1RAPL1, WDPCP, VCP, PCSK9, NKX2-1, SLC35A1, LAMA3, SLC14A2, COCH, SLC30A2, SCGB1D2, SLC11A1, SH3GL1, SLC25A39, EIF3H, KIF1B, GSK3B, GPD1L, KIR2DL1, TNFAIP3, PLA2G10, ADAMTS17, BLK, TAAR9, CLCNKB, APOM, PKP2, SPATA16, AMPD3, NPHP3, PTCSC3, TSEN54, MMP1, FBXO7, CA12, PDE6G, HLA-DQA1, STH, GCLC, ZC3H14, CBX2, MAN1A2, ALDH5A1, FKTN, CTDP1, CRTAP, ZNF75D, IL18RAP, KRT86, STMN1, DPP6, MKKS, STK39, CD109, SFTPA1, RHO, GRID1, TP53I3, BANF1, CR1, SLC22A3, HMBS, EBP, TOR1A, P2RY4, TRPV1, SLC25A15, GADD45B, UCP2, TDP1, FOXG1, WFS1, RAD21L1, PROC, PABPN1, SLC01C1, TAAR6, SLC22A5, GRIN3A, FPR1, ATL1, ASPN, SMOG2, SERPINB11, NDE1, PPARD, FSHB, HLCS, AK1, CLNK, TBC1D24, STK10, LGALS2, AAAS, ABCD3, C4B, DGCR8, GSR, NEU2, CACNA1C, FIG4, IGHMBP2, SP7, BHLHA9, CCL11, IDO1, OBSL1, SLC23A1, SLC39A4, CITED2, GRM3, FCGR2A, RBMY1A1, GPIHBP1, KRT9, FOXP2, HTR1A, NLGN4X, ALOX12, CCDC103, RB1CC1, POLR3A, NEIL2, EIF4E, ABHD5, EXOC4, GSC, TRMT1, KMT2D, IMPG2, SLC29A4, MMP3, CRHR1, TRAF6, AXL, LMNB1, PNPLA3, F13A1, SLC10A1, CSNK1E, BRCA2, ACADM, KCNQ4, FMR1, FAM8A1, TUBB2B, CXCR1, BBS9, USP15, SLC12A3, C9orf72, PTGER2, SLC5A7, ERCC4, SLC31A1, MMP8, ESAM, ACY1, RNASEH2C, PKN3, COMMD1, CBX4, BLMH, NTRK2, ADCYAP1, MFGE8, SP110, KIAA0513, SH3BP2, SH3TC2, IL10, DHH, AGRN, CEP290, CNPY3, RTN2, TFB1M, PRPH2, IRX4, DXO, SPANXN5, NFKBIL1, TLR10, CHD7, APBB3, WDFY3, SLC30A8, CEP63, RPS10, DPM1, IAPP, KLK7, ALOX5AP, LRP1, NKX2-3, GP1BB, ANKH, RIPK3, TAS2R9, RFT1, RAET1L, SLC6A1, SH3PXD2B, SAMHD1, OCLN, EPC2, ATP13A2, NELFA, NAGLU, PAX6, KRT4, SCG2, CDON, TREM2, SERPINI1, MMP14, FMO3, POU4F3, MDM2, KCNK9, TAP2, CALHM1, THSD7A, NBEA, LHX4, AKT2, EGFR, MAP3K15, NDRG1, PTPRQ, GBE1, FMO6P, SNORD50A, SOD1, SIRT5, BCR, ZFP36L1, PAPD7, CYSLTR1, NKX3-1, CHD2, TRIM17, GALP, ERBB2, CREB1, FANCM, TRAK2,

DDX3Y, LGALS3, UGT1A7, MYT1L, CFL2, TMPRSS3, UPB1, FUT3, KCNA3, CLDN14, DBI, PIF1, LPIN2, CDT1, SMARCA4, DIABLO, TRHR, TPSB2, LRP8, TGFBRAP1, MASP2, CNTN1, AGL, BBS4, MINPP1, CCL3L1, TMEM43, HS6ST1, AKR1D1, STAT5B, PRPF8, SCT, SKI, OAS2, GLIS3, MPP6, TBL1XR1, KRT16, G6PD, KLF5, TNFSF8, NUDC, PROKR2, VCX3A, TACSTD2, HBE1, BCAT2, C5AR2, NRG3, FOXI1, MYOC, F10, BCKDHA, GIF, COMP, THBS1, TAL1, TCAP, PLEKHG5, SNAPC5, MOCOS, VIP, SLC6A8, CALCR, MC2R, TBX3, CHRFAM7A, VCY, DIO2, MPLKIP, PRX, RAD50, TRIOBP, CABIN1, SYNE1, MTHFD1L, MBTPS2, MVK, TUBGCP4, TSPYL1, UVSSA, NCOA1, CDK7, CRELD1, CHEK2, GAS2L2, DRD4, ADH4, CD247, CDAN1, GRPR, SYT11, MCM4, DCAF13, SPTBN2, HTRA1, SLC26A2, ATP2B4, SPATA31C1, PTH, TARDBP, SLC24A1, LRSAM1, B3GALT6, CETP, APOC2, NXNL1, PTPN6, HADHB, ADAR, P2RX1, ILDR1, ARMS2, HBM, GRIK3, PDE10A, GRXCR1, CACNB2, EN2, TCTE3, RHOG, HBB, HEY1, KNG1, CASR, GPAM, CANT1, IRF2, RUNX2, PGR, GRK4, SRPX, PRPH, FGF10, ODC1, SDC3, MC3R, PHEX, SOX6, MSMO1, THRA, POLH, PTGES2, ENO3, COL4A6, GAS1, SGSH, SLC35G2, CXCL10, TRPM3, GALT, PLG, FECH, TYR, ATP6AP2, TACR3, SLC7A7, CA8, SLC35C1, IL10RA, KIF1A, IL36RN, VCAN, UBE2A, TSLP, NHS, CNTNAP5, SLC1A3, RNF139, SFTPC, RPL35A, SHANK2, MIR140, JUP, SLC41A1, LRCH1, RBMXL2, SULF1, PRDM5, DCXR, RAB11FIP5, TTTY13, SOHLH1, CDKN1A, LPL, MAGEE2, CLEC2D, HCN4, HFE2, CUL7, LIPC, DIO1, EIF2B1, GSTZ1, SLC6A12, RASA1, ITCH, ZCCHC13, GATA2, SLC2A2, EXO1, HRC, GABRA5, PIK3R1, GPC3, TAF1C, MAF, PDGFRA, PTPRJ, CSTB, TET1, ADRB3, DMD, FAM205A, MS4A12, FPR2, OTC, FOXH1, AGMO, KCNQ3, ABCB11, SLC22A12, FZD3, TMIE, HADHA, CCBE1, DLG5, SAGE1, PER1, ZFYVE27, SMARCA4, BMI1, VMA21, MASP1, SLURP1, SHOX, ATRNL1, MIA3, AREL1, TMEM135, G6PC, CHRM3, TBX22, TOMM40, CPE, UPF3B, TUBGCP5, NOBOX, ADNP, POLD1, VIPAS39, BTBD9, LCAT, MIR196A2, APOA4, POMC, PMS1, IL9, HOXA11, RAB28, TFCP2, NLRP12, ALAS2, ST3GAL5, RPN2, NFKBIA, CNOT3, MIR2861, IGFBP3, GAK, PSMA6, ARHGAP24, ALB, C4BPA, CPT1A, C1QA, ALMS1, KIF22, DCN, GSE1, PRB4, NINJ1, EFR3A, COL11A1, UCP3, FOXF2, MLH1, VAMP7, IFNAR2, HLA-C, CYB5A, SCN10A, NXF5, MKS1, P2RY11, CX3CR1, ITGAE, PLP1, KISS1, ZNF804A, FUT2, PTCHD1, FZD4, NARS2, GALNS, TMLHE, SERPINB3, LIN28A, KCNJ11, FAM20C, TSPAN17, ABCC8, BPI, DHRS4L1, BNC2, SERPINA3, XKR4, MCPH1, MT2A, FABP2, SYNM, BMP2K, ALG1, TBC1D23, HEXA, HNRNPU, MAP2K3, FLT4, SCAP, OMG, NDP, SLC4A4, FKBP6, BRAF, TWIST1, EPO, PAX5, GJB4, COL1A2, DTNA, LY96, AANAT, AKT3, CRB1, KLK3, IL1R1, LTBP3, KHDC3L, AMHR2, DDX20, PROCR, PHKB, PHF11, PASK, HEPACAM, KMT2C, SI, GGT5, KCNE4, TRIM5, KCNS3, APOC1, BAAT, ARID1A, MBD1, MLYCD, FLVCR2, ZBTB40, AP1S1, SDHA, CYP4B1, COL12A1, ALPL, SMAD6, CHST3, SAT1, BTAF1, COLQ, NRXN2, UGT2B28, HYAL1, ABCA13, PNP, HDLBP, RFX2, MAPK8IP1, CHRNA7, PIGM, GNB3, FANCD2, ARL6, MEF2C, PSPH, LBR, IL2RG, AFF3, COG7, MYB, XRCC2, RPTOR, ERBB4, KANK1, ZAP70, GPHN, DNASE1, SLC6A2, LPP, PTPRCAP, IL12RB1, ATRX, DMRT1, CHST8, ACTN3, ELP4, RYK, IRS4, HSPB6, NMB, GSTA1, MIR146A, TGFB2, SEMG1, TRAF3IP2, CHRDL1, CHRNE, LAMA2, HSPB8, RLBP1, GAL3ST3, AXIN1, ARVCF, TRIO, POLR1C, NID1, ID3, KIF7, C1QC, MMP13, C8A, MTM1, CAPN3, CSNK1A1L, HCP5, RNF170, KBTBD13, KCNE1, CD4, DSP, NDST1, IRF1, FAM20A, SDHB, CLRN1, MBL2, SH2D1A, MUSK, TPP2, PLIN4, GTF2E1, PKD1, JAM3, DDOST, CHSY1, DIRC2, MYOM1, PHKG2, EXT2, DIAPH2, DOLK, ACVRL1, CLN8, MECP2, FCGR2B, DIP2C, NFATC4, NOS1, SNIP1, BMPR1A, YBX2, PRL,

TIMP3, RFWD2, CIB2, ABCG1, LRTOMT, ARL11, SPAG16, CREB3L3, COG6, TMEM127, ARHGEF12, RAC2, GLUD2, CD55, PLN, PRDM9, SMAD3, TBX5, RHD, HMOX2, PTGDR, GJB6, CCDC39, ZNF513, PLP2, HTR2C, MDH1, ITGB4, KRT13, CACNA1E, PEX14, FMO4, PAFAH1B1, OTOR, DRD5, UBE2I, FYCO1, FBLIM1, PLTP, MUC3A, DUOXA2, CNTN4, ANGPTL3, MYO6, DNAJA4, DOCK8, EZH2, MYO1C, FAS, KIFAP3, PON1, SPRN, HBEGF, OSMR, SOD3, CYP21A2, CYSLTR2, ZC3H3, DDAH1, ACBD5, MGAT1, ALDH4A1, UGT2B15, MIR502, DNASE1L3, CRYAB, PRY2, SLC26A3, KIF11, SLC40A1, PTHLH, TNFRSF11B, PKLR, OR7D4, MIR27A, CD36, EXO5, OPN4, ARF4, OR13G1, CLK2, ZPBP2, LMF1, TNFSF15, FANCL, NCF2, SECISBP2, SLC12A6, MRPL48, XRCC6, GABRR2, HUS1B, PIK3C3, DHDDS, PAX9, NEFM, C1QTNF5, BCL9, SYN1, ABO, PIGV, TRAF3, LETM1, APBB1, NIPSNAP1, F9, LIPE, B4GALT1, CNGB3, CHD3, BCAP31, CHD6, HMCN1, CD40, FGD4, GDI1, ZNF81, PDXK, CCM2, EFTUD2, TAP1, LRRC4, CYP11B2, IGFBP7, FCRL3, SCN4A, FGB, EHMT2, EPHA5, OVGP1, FOLR1, HACE1, MYOT, HAL, BCL2L2, EMG1, AQP4, MERTK, RD3, SLC47A1, ORMDL3, TBXA2R, ALOX15, DMPK, TECR, SMC1A, CCL7, TP73, DSC2, GRIK4, TMPRSS6, ATP13A4, SERPINA1, ANTXR2, COL4A3, SLC6A18, PEX1, TAPBP, RET, MASTL, RUNX1, FADS2, IL1RL1, ALX3, KIR3DL2, MID1, SNX10, LIPH, ATP2C1, CYP4F3, ALDH1A2, GABRG1, AHCY, ALG12, CCL17, KHK, ESRRG, CNGA1, RDH5, ISPD, GLP1R, CD58, CSTF2T, TRIM37, TMEM8A, IFNL3, GRHL2, SELE, NLGN2, PROKR1, ABCB1, CNR1, GPR12, ABCC4, DLG3, MFRP, CC2D1A, STRADA, PLAGL1, MAGT1, NR2E1, MS4A6A, LLGL1, FTL, KLF6, THBD, NR5A1, SRR, CYP4V2, CHKB, HUWE1, FAAH, IL17A, TMPO, ACCS, LEPR, LTBP2, SV2B, CYP2A6, PGBD1, GP6, SLC25A22, ILK, SLC22A1, EYA1, PITX2, MYBPC3, GJA4, FABP3, RNF113A, MYPN, CAMKK1, SIM1, NHP2, SATB2, CLCN2, KCNJ9, ZFHX4, DPM3, AP4B1, SLC25A13, SMPD1, TH, COL6A2, ANKS1B, MFSD2A, CHL1, VANGL2, CNTF, AKAP10, FA2H, ALG13, KLHDC8B, TRD, SLC13A2, GSN, EGR2, WWC1, FRMD6, MYH3, SULT1A1, HOGA1, ANK2, RAB23, PLA2G4A, AKR7A2, FKBP10, VLDLR, CERKL, MAP2K2, DBT, SLC1A2, INVS, MPO, ZBTB16, PDGFB, ELN, NTF4, VIM, MPI, TLR8, HPS3, ABCC3, HLA-DMB, SPR, HOXA10, KIF21A, RHAG, LZTS1, CLUL1, CPN1, HLA-A, RSPO4, LDHA, EDNRB, SLIT3, CD27, PEX13, EGLN1, MIR106B, GRIN2B, NR1H2, NLRP7, CD226, TCTN1, STAT3, WDR36, TPCN2, MBD4, ROBO1, ATN1, ARSB, ORAI1, TSSK3, RUVBL1, ADAM9, TPH1, MAD1L1, APAF1, UBA3, NEK1, MYH11, MATN3, IFNGR2, NDUFA4, ANKRD11, ITPR1, SEZ6L2, SEPT9, DDAH2, GUCY2D, ATXN3, CIDEA, SLC26A4, SLC45A2, H19, SOX17, PAK3, DPYS, TGFBR1, PWRN1, WDR4, HK1, VPS33B, NAA10, HEXB, ACVR1C, NDUFAF7, MIR24-1, GALNT12, POMGNT1, TNKS, CRLF1, ABI3BP, PYCR1, GRHPR, WAS, MADD, ATM, LTN1, HSPA1A, BLOC1S3, TINAG, NEUROD1, IL17RB, GNAS-AS1, PARP2, GSTT2, CAMP, ADAMTSL2, PPIB, CYP2A13, UGT1A4, GOLGA5, SMPX, ALDH7A1, LCA5, KCNJ10, DHX37, UGT1A6, ANG, ACSL5, SMAD4, NMT2, SLC6A20, RRP1B, PFKM, EEF1B2, STAT6, DKC1, CCDC40, PER3, DAZ1, SCARB1, CACNA1F, UBD, DNAJB6, NAGS, GREM1, SUN2, PRKAG2, AGXT2, RFX8, KERA, PPT1, MLLT3, UBE2B, NUMBL, MUC4, MST1, PLOD3, SULT4A1, HAVCR1, BPY2, C7, WASF3, DYNC2H1, GLYCTK, MTUS1, GABRA6, UROS, MMEL1, TRAPPC10, LEMD3, MGMT, AIF1, MR1, FFAR1, CSH1, MAP4K5, F8, ACHE, SLC28A1, KRT6A, EGR3, MYO7B, SERPIND1, PTF1A, IFRD1, LCE3B, SIGMAR1, MTNR1A, PPP1R3A, MCL1, PABPC4L, PRNP, ACTN2, SHMT1, ADCY10, FOXA3, NEB, KLK15, TLR3, IL6, CTGF, FGF14, POLB, BRD1, PRICKLE2, ZNF335, MTMR9, MCCC2, CPT2, IVD, NSDHL, UGT2A1, EPOR, TOPORS, CLDN19, CASP3,

CACNA2D3, CCRL2, RNF213, TMEM67, SLC7A2, NCKAP1, HSD3B7, VDR, ACE, AGO1, TAS2R16, IRF4, OPN1SW, ZNF213, ITGAM, L1CAM, DSPP, RGS2, MST1R, DLL3, FASLG, COL3A1, MIR126, CACNA1D, ETNPPL, PRKAA2, ARHGEF11, UHRF1BP1, PIK3R4, NDUFV3, UBE2NL, KRT14, PACRG, BBS2, ABCG2, PGAM5, GRB10, TBL1X, PCDHA10, SPAG17, HNF1A, EPHA3, NIPSNAP3A, INSIG2, STXBP2, FUT1, PECAM1, MS4A1, TMEM9, PTPN1, PEX2, MYH14, IFITM3, CC2D2A, DNMT3L, DSC3, WDR11, TBX4, BTN1A1, B3GNT3, NT5C3A, LHCGR, GPR179, CNR2, CD59, PLCG2, HRH3, TTR, CAPN13, HTR2B, CCR1, CRYGD, PGRMC1, MAOB, ITGA2B, CACNB4, PTGDS, PSAP, NCS1, CHM, CYP1A2, STX1A, LYN, BPIFA1, TGFB3, POMP, ELK1, HGD, BMPR2, KLF7, B3GALNT1, MYO3A, ADAM33, DNASE2, MGAT2, MSH5, TCN1, NOP56, PYGL, CTSG, GRIK1, CUL5, ICAM4, FPGS, NOD1, SOX5, KIF6, OTX2, DSCAM, SLC5A5, MCOLN1, IL12RB2, NFIX, SLX4, PLA2G5, PALB2, SEPSECS, RNASE3, IL9R, MED17, DIP2B, PIK3CG, BCORL1, PIGA, LPA, COL4A4, TPP1, IL17REL, C8B, UTS2, GJA3, TUBA8, TMPRSS5, BRAT1, STIL, NQO1, CYP3A7, RPL5, NODAL, HSPA9, FFAR4, AXIN2, HCCS, LHX3, MIR934, TAF1, MYO15A, S1PR1, CD79A, CIC, PIK3CA, HCN2, IRGM, ITIH6, SLC9A6, HTT, KDM4C, SLC6A5, DAZL, ERBB3, HAND1, CYP2C18, FGA, IGFBP1, IFI44L, SLC1A1, *loc344967*, FREM3, PSAT1, PTPN21, MOK, TBC1D1, IQGAP1, IFNG, TGM6, AGPAT2, EMD, RETN, APH1A, SLC6A19, SLC12A1, CYP27A1, GTF2IRD2, WDR35, FOXL2, HTR6, SLC7A9, SMC1B, KCNQ2, GRM5, PEX3, FGF2, *C2orf71*, CLU, PRODH, CXCL12, DIAPH1, CORO1A, OPRD1, *C19orf12*, COG5, AKAP9, LGI1, CRYBB1, SIL1, GYPB, FEN1, IGF1R, WDR72, UNC93A, SPTB, EFEMP2, DEFB126, PKD1L1, MIR191, PCM1, CAV1, ALDH1A1, NLGN1, FMO5, HPRT1, TNFRSF1B, RNASEL, DNAH9, FANCI, PIGN, IGHA1, SHROOM3, RAD54L, SNRPN, HMGCL, ALX4, CACNA1S, CORIN, ABCD1, PLEC, NCAPD2, ANK1, ASNS, POLR1D, GJD2, ABCB4, EPM2A, USB1, SETDB2, SFTPB, FAH, CARTPT, HNF4A, CNTNAP2, TNFRSF10B, USH1G, FRK, TBX19, CDK5R1, PAX8, OPN1LW, SNORD115-1, HIF1A, SLC2A4, TSEN34, RPS19, FEZF2, SLC26A9, KIF18A, C1QB, MAP2, TNFRSF11A, NOS3, TRAC, SEMA4G, CYP11B1, KCNIP4, CDC73, CFTR, VSX1, GSTM3, MIR96, SPRY3, KCNA5, WRN, SLC47A2, ST14, RHBDF2, XBP1, CEBPA, ACSF3, FBXW11, CRYGS, ALOX12B, TDGF1, ERCC6, NOS1AP, DGCR6, PRMT3, PTPRO, CD3G, CDKN1C, PPAT, SIRT3, AQP1, COL17A1, GFAP, NIPA1, IL7R, ACTB, LCE5A, TLR4, BSCL2, CFHR2, PCDH9, MKRN3, ADAMTS13, SLC30A5, HSFY1, ACVR2B, IYD, SUFU, NKAIN2, SPATA21, CYP2C8, MYO7A, CD96, ACVR1B, MIR17, ROM1, CSNK2A3, SFTPA2, MLH3, CD1E, IFNGR1, MAGEL2, SLC29A2, CD320, SMG6, MPP3, INSR, ARHGEF6, TGFBR2, TLR9, DEAF1, GLRB, AMN, ITGA11, PTCHD3, MBD3, MDN1, HLA-DRB1, PGC, FGF3, TNFAIP2, FOXN1, IER3IP1, PEMT, ARHGAP6, MCM3AP, KCTD7, NOG, MYO1F, ST3GAL3, HLA-B, PPP2R2B, TCF7L2, TCTN2, VSX2, GPD2, RBM8A, ITGA9, SCUBE2, VANGL1, DAOA, PIGO, FABP4, GPANK1, DDX58, AKT1, GBA3, MCM6, ABCA7, FRZB, RPGR, COL6A3, RP1L1, APOBEC3G, CATSPER2, PTCD1, GNPAT, ZFH3, SCRIB, AURKC, CYP2B6, CAMKK2, FZD6, PITX3, PON2, UNC119, KLK1, MLXIPL, MAP2K1, GH1, HPS5, ANK3, SLFN5, KRT5, GNAT2, TIMP2, SIX1, CDH12, ARSE, SREK1, GTF2IRD1, CCDC22, MAK, BSND, COL6A1, OAZ1, COX4I1, AMT, SGCE, WNT4, PRSS8, KCNK18, FRMD7, TCF7, TDO2, SAMD9, KITLG, HSD11B1, KRT6B, SUMO4, SATL1, AKR1C3, SETX, CACNA2D4, DDR2, COL5A1, TMEM2, IL20RB, ZNF592, SERPINC1, CFP, DCTD, F3, CTSZ, DOCK3, STX16, NR1I2, KCNJ5, LMNA, CASQ2, APOA1, PYGM, PRICKLE1, WNT5B, TAS2R38, CRYBB2, SLC25A38, FTCD, PSEN1, CTHRC1, GPC6, HIP1, MCF2L2, WNK1,

CDKN2A, LPAR1, TSHB, SCN2B, RELN, RECQL4, NKX3-2, HAS1, DPAGT1, ST7, TRPS1, CASP2, ATCAY, TM4SF19, DOK7, ATG16L1, LCE3C, JUN, CSF1R, MYL2, PTH1R, NOTCH3, NF2, ADAMTSL3, TREX1, TNFSF14, PRRT2, AOAH, CA6, ESPN, CEP57, AR, CRKL, SESN2, NUP62, GATM, AP4E1, ZFP57, MYO18B, PGD, RSPH9, ARHGEF10, MPG, GAD1, CASP12, AMELY, CLCF1, MIR30C1, DHX36, HDC, KLHL3, SYTL3, SCGB3A2, TNR, ADCY9, DPP10, ATP6V1B1, NOTCH1, PTPN13, SLC22A9, OCA2, SSTR5, PNPO, PDYN, DAPK1, SUOX, IDH3B, CDH5, NPC1, GSTT1, UGT1A3, CD40LG, CES1, TRAF3IP1, UGT1A5, SMARCE1, VRK1, B3GAT3, RASSF1, ICAM5, AARS, CYP3A4, SLC27A5, ACSM2B, IL7, SAR1B, SCN9A, APP, POU5F1B, GATA4, MNX1, C6, PRSS1, HLX, PTGIS, MDM4, ZNRF1, MAMLD1, NDN, HBA2, FBLN5, SNCB, TNNT1, RAB7A, PMS2, HELQ, ITPR3, CBR1, RNLS, ZNHIT6, SRY, HMSD, RAB2A, ACTN4, HPSE2, PLCE1, INSL3, MLC1, EIF2B5, KCNJ2, PINK1, PSTPIP1, CYP26A1, CNBP, SLC4A1, HSPB1, PMPCA, HSD17B1, DMP1, MPL, RMRP, CUBN, ADAM12, IGF1, SLC52A1, HSD17B10, HSD17B2, NUP155, RBM15, TAS2R43, FRAS1, DAZ3, GDF15, CYCS, TECTA, PRKRA, HMGCS2, B9D1, MITF, NKX2-5, GYS1, BTN2A1, DDX11, DNAI1, CACNA2D1, DEC1, SLC33A1, HRG, PROP1, PON3, RPA4, HCN1, SYCP3, MSH3, UGT2B17, FGFR1, FXYD6, MTNR1B, SPECC1L, CLCNKA, TTC37, HLA-DRB5, GOT1, GPR143, TMEM39A, PCSK1, HOXA1, PIKFYVE, UGT1A1, SYNGAP1, HOXA13, PCOLCE, FRY, CSF3R, UTF1, DKK2, IRX5, HERC2, HSD11B2, LRFN5, HNMT, ITM2B, PAPSS2, ASPRV1, CYP2C19, PIK3R5, UTRN, CDK11A, COL9A2, KRT1, PALLD, IMPDH2, TLR1, TENM4, AGBL4, ZIC2, SMC3, GSS, SIX5, FIGLA, CASC16, KCNA1, HSPA1L, SSTR2, CLN5, BIRC5, CHRNA5, CES2, GNAS, DDB2, DDX53, GHR, DUX4, DYSF, GOLGA3, CDKL3, MTRR, BBS7, HTR7, GLE1, RIPK4, ASB10, MS4A2, BHMT, NPC2, LAMTOR2, AVPR1B, MSMB, ALDH18A1, TPI1, DNAJC5, GATA6, RPS4Y2, MSH6, ALDH2, AIRE, C3, QDPR, MRAP, GJB1, PIN1, SLCO2A1, FOXA2, RIN2, PDE6C, SIPA1, APOC4, GSDMA, MIR34B, NDUFA8, UBR3, DNM1, UGT2B10, UGT1A10, SORT1, IGHG2, USP7, ASCC1, RBFOX1, SERPING1, KIR2DL4, MEIS2, FZD9, HESX1, TNFRSF10A, ASIP, SCP2, KL, GNAT1, IFT140, ALCAM, MPP4, ERLIN2, SLC22A6, CEACAM16, GPD1, ZNF41, CDH15, NPM1, BCAM, ADAM19, FKRP, HLA-DRA, SSX7, GCK, DNMT3B, GUCY2C, ADRA2A, TERC, DAO, ADAMTS16, WDR19, EDNRA, NIPBL, POGZ, EFHC1, GHRL, GUCA1B, SLC17A3, ZNF24, WT1-AS, FRA10AC1, LDHB, CRYBA4, HVCN1, RYR1, PENK, LTBP1, TRIP12, SMAD9, FGF8, KCNE3, LRRK2, MBD5, LIF, OXTR, ACTC1, KDM5A, PSMC3IP, EPX, WNT3, ATF1, ZBTB18, DYNC1H1, FGFR3, IL5, HES7, CLSTN2, KRT37, FSCB, BBS1, OPRK1, CDC6, CST3, SULT1C2, CHI3L1, WDR62, DHX16, PKHD1, HPS4, CRP, OCRL, TTLL11, GLA, NEBL, HSPA8, CEL, IMMT, PICALM, AGGF1, ADAMTS2, ARPC3, MYH13, NPHS1, TRPV5, COLEC11, HOXD13, TCF4, APOBEC3B, CDY1, MED12, ABCC11, GALNT18, MYH2, CYP7A1, ASAH2, AURKA, SRD5A2, PNPLA6, SPG11, KCNJ13, AP3B1, AKR7A3, IGLL1, DNAAF1, MIR182, CSRP3, FN1, MTR, MMP20, KRT17, DHFR, ZNF711, CHRNA2, TTC21B, TPMT, DGKD, LOXL1, IQSEC2, UBQLN2, NR1I3, MEGF10, PRRX1, FAM83H, KLHL9, GAA, SCN1A, STRC, RPL10, GDF9, ECE1, HCK, LIPI, CDHR1, CSTA, DISC1, GABBR1, MIR890, NIPAL4, SCN3A, CLTCL1, NUA1, ALG6, CDSN, NPPA, LAMB3, MOGS, CATSPER4, OPN1MW, FMN1, CARD14, CCL26, RPE65, NCOA3, MTHFD1, PLA2G6, ZFPM2, DEFB4A, SEC63, PIEZO2, FTH1, GC, PAFAH1B3, ADRB1, ALDH6A1, SNTG2, G6PC2, MUC5B, CTSB, ZFP36, UMPS, TNF, COG4, FANCA, BFSP2, PGAM1, FRMPD4, GRM6, IKBKG, NGFR, KLHL10, MEIS1, NSD1, CRYBB3, EDAR, NEDD4L, EGF, GNRH1, IL1A, BRCC3,

CACNA1H, ERCC1, CAV3, HARS, KCND3, AGO2, TRIL, CREBBP, AKR1C4, PARK7, PAX1, AP4M1, COQ5, TUBA1A, SGK1, ABCC2, COL5A2, NOP10, SELP, IFT43, NAIP, MYOZ2, XRCC4, SOX10, AOC1, KIT, SIGLEC16, TRAPPC2, KRT8, PDE6H, EPHA7, SCN4B, PPOX, SERTAD1, HAND2, NSMF, ANTXR1, RHCE, DGAT1, TAC3, RAD54B, ATG7, MED25, SPP1, GLI1, FBN3, BARD1, DGCR5, SFTPD, MCFD2, MIP, F2, ZNF627, EIF2B2, WNT5A, TRPA1, GNS, FDFT1, PEX26, PTGS2, BMP7, CFHR1, ADAMTSL4, LRP5, ARFGEF2, KLK4, NEFL, CTNNB1, GALNT2, NAV2, ADH1C, DND1, ATXN7, EFCAB5, STK3, IL21R, REPS2, ANO10, FCGR3A, CYP2C9, DNMT3A, FSHR, FCAR, WNK4, KRT83, BMP15, GAD2, ITGA6, BAG3, C1GALT1, CCND1, CTSK, PIK3C2G, PRKDC, IMPA2, MSR1, TRPM2, EXOSC3, ZFP90, ATXN2, RS1, S100B, BMP2, LAMC3, NPY1R, UGT2A3, PCDH15, CHDH, ESR1, GCNT2, GABRG3, SLC01B1, SST, KCNN3, PRF1, CDK4, GIGYF2, ITIH3, CD79B, EDA2R, IRS2, CLN6, ANAPC1, DMXL1, PTPN14, GPR1, HTR5A, GRM1, RAPSN, PDE4D, TRPC4, ROPN1L, GEMIN4, GAP43, KCNMB3, KLK12, PCDH11X, TMC6, DMGDH, RIMS1, OTOF, XYLT2, TEX14, RRH, DRP2, DHCR7, PDZD7, FGFR4, SLC19A1, POR, SREBF2, PIK3CD, ACAN, TGFB1, ALG11, DOCK4, APEX1, ZIC3, CEP68, EOMES, PAX2, SCARF2, MPDU1, PSEN2, KRT31, PTGIR, FOXE3, ART4, PRM1, NLGN3, DAG1, WWOX, TIMP1, ABCA12, GP2, PLOD2, CHIT1, RPS24, PCSK2, PI3, MRC1, MAVS, SMG1, IL13, CD86, FAM91A1, LFNG, PIP5K1C, CHD1L, GPT, CNKSR2, CSAG1, FUT8, IBSP, AGA, SNURF, B9D2, STAT1, CPZ, POLR2M, IGFBP5, ATXN3L, NRTN, MMP12, TNFRSF25, PEX11B, GABRA1, HABP2, REEP1, BMP10, MYOCD, SLC2A1, CER1, ATP2A3, PTGER4, CCR7, KCNQ1, EPCAM, BCL2A1, CTTNBP2, ZBTB24, SPAST, PLXND1, NLRX1, BSG, SLC26A6, PDE7B, FN3K, MS4A3, EFEMP1, BIN1, FGF11, ALS2, TRIP11, MOCS1, DOCK6, SYP, GLCCI1, PTPRC, OLFM2, MYO1E, DUSP23, CD14, ABCC9, SNAP29, HMGCR, WDR45B, CDH3, INSL6, NR3C2, NPAS2, PRSS3P2, IQGAP3, CRADD, BLNK, CHGB, COL9A3, IHH, IL19, DIAPH3, DOC2A, XKRY, UBR1, GGH, ADARB1, COL9A1, MCCC1, VPS35, GPC4, COL4A2, SRCAP, LUM, C1S, BPGM, TCF7L1, GFPT1, HMOX1, GLO1, MC4R, FAM126A, TRPM7, INS, ERAP2, FLT1, PFAS, ALOXE3, EXT1, SMAD2, FCGRT, EIF2B4, SIX6, CCR6, TSSC4, TSPAN12, COL11A2, PLD2, ASL, GATA3, TFAM, ZNF365, ALG10B, ARX, LDLRAP1, ANGPTL4, HHEX, GTF2H1, FLCN, MPZ, NAMPT, CYP4F22, ABCA10, UROC1, FOXC2, HDAC4, GLRA1, CTNS, GDNF, FAAH2, TRPC5, SCGB1A1, TEP1, GSTM1, CRH, ACP5, TBCE, CA4, PLCB4, HSD17B3, SAG, CTRC, HOXA2, TSC1, MSH4, DKK3, TULP1, CYP27B1, FTO, VPREB1, USP46, SPI1, GYS2, PLAT, TNFSF11, RPGRIP1L, PTPRF, BLVRA, POLL, FRG1, TYK2, MUC6, MYL3, NRL, THBS4, SDHAF2, RAX2, PIP4K2A, MYLK, CYP4F2, UNC5C, HOXD10, CXCR3, KIF17, CHI3L2, GPBAR1, SRPX2, CBR3, CTLA4, UBAC2, PLA2G2D, AQP3, RAB40AL, GLMN, KRT6C, CSGALNACT1, APOH, PDX1, LCN10, PRPF31, TLR7, SMAD1, PLCD1, NPHS2, RAB3GAP2, CLCN1, CLEC7A, SOGA3, IL17F, MUT, IL4, SELPLG, NAT2, TTC8, POU6F2, OPCML, ALDH16A1, F13B, KRT38, HLA-DPB1, XIST, HSD3B2, GNE, MGAT4C, CEP85L, SLC39A13, ARL6IP5, TUSC3, GABRD, LIPG, MYF6, MGST2, TRPV4, APOD, NEK8, SULT1A3, RBBP8, HDAC8, PLCZ1, MED13, SIGLEC12, SCN1B, ACVR1, DNAAF2, STAR, RNASEH2B, F2R, PHF2, KLB, TAS1R2, MTAP, ADORA3, COL6A5, ASMTL, PIK3R2, GZMB, FCGR3B, BMP1, CYP3A43, AKR1B1, SRD5A3, HLA-G, TMEM114, CYBB, LRP2, SART1, SPTA1, GEMIN2, SEMA6D, PMAIP1, SLC25A20, KCNJ3, MYCN, C2, RPS6KL1, NTF3, GCKR, TRPC6, GSPT1, SNRK, ANKK1, GUSB, GSDMB, EXTL3, LIG1, HYLS1, DNMT2, EHMT1, GLDC, FBP1, PLA2G7, RAX, TERT, PDE6B, DLGAP3,

FUCA1, KRT18, SOCS1, CDK5RAP3, IL17RA, YTHDF2, ST5, GGCX, STRA6, CAMK4, ROBO3, CPLX2, RB1, PHLDA2, TST, SLC35D1, NDUFA7, POP1, SLC29A1, SAA1, ALG8, SHOC2, SRC, FBXW7, NTNG1, CYB5R3, NR0B2, TFAP2A, ADTRP, PDE4B, ZNF507, IL1RN, MAFB, TCTE1, RFX6, PHF8, ADIPOR1, DNAJB2, TFPI, FABP6, SGCD, BBS5, CYP17A1, TWIST2, SCG3, ESCO2, CD209, GJC2, SBDS, ENO1, GABRB3, PCBD1, COL6A4P2, GIPC3, MAN1B1, TPTE, GOSR2, BFSP1, COL4A1, STK19, GRM7, TNFRSF13B, GLS, STS, LGALS13, IL4R, LHFPL5, GLI2, SHROOM4, CCL5, BTNL2, TGIF1, TP53, PEX5, ENTPD1, STK11, MX1, LOX, YARS, EME1, MIR184, NLRP1, UNC80, LAMB2, HNF1B, TGFB3, UMOD, CASP9, PDCD1, ATP6V0A1, IMMP2L, MIPOL1, ZNF469, LAMP2, CAT, SLC7A1, ATXN1, CPOX, LAMC2, TIRAP, KIRREL3, APH1B, ADAM17, CTNND1, GABRG2, CHRNA3, F5, LYZ, TPM2, CPS1, CNDP1, ABCA2, ATP10D, CFLAR, IGBP1, PRKCH, NRXN3, CDKN2C, ACACB, STXBP1, ADM, PREPL, FGD3, RHPN2, GHRHR, ABCB6, CD22, FCGR1A, IMPDH1, PRKACA, PPP1R1A, RPL11, KATNAL2, TRPV3, NMU, ASXL1, IFIH1, IDH1, SEMA4A, XRCC5, AHSG, POU5F1, INHA, PMS2P3, CLDN1, ICOS, NFKB1, SIRT1, MANBA, ABCC1, GFRA1, NKX2-6, RBP3, PRM2, IL1B, MUC13, HAX1, REN, GDF1, ACTA1, WRAP53, TDRD7, SP8, CTSA, CDKL5, KCND2, NSUN7, ELP2, WIPF1, PIP5K1B, AGXT, IGF2R, INPP4A, MMADHC, DAZ2, ATP8A2, IL12B, SIAE, ZMPSTE24, DDX39B, UBE3A, MT1A, SNRNP200, DDX25, NCAN, SOBP, ASMT, RNF114, ORC4, ITGA7, TSSK2, TXN2, CLEC11A, DNAL1, TAF15, HAMP, SREBF1, IDE, NOD2, CERS6, GPR68, IL21, HTR2A, LTK, FUT7, SCNN1G, EPAS1, RAB18, COL8A2, GYG1, TPH2, PHB, LPIN1, KRT12, BAALC, TNP1, WDR13, HSPB7, PMP22, PGAM2, PEX12, APC, CNNM2, LOXHD1, TLR2, HTR3E, GPR139, GPX1, SBNO1, P2RX7, LIMK1, POLR2E, PSCA, LRAT, HIGD2A, MACROD2, TBX6, IL18R1, BCL10, GLB1, GAS6, TSHR, MOCS2, HCRT, NAT1, SULT2B1, CYBRD1, MTCH2, PEAR1, AUTS2, MMP10, TCN2, CDA, TFF1, ZFY, PPARGC1B, EPHB2, ACTG1, CHRNG, CALM1, TAS2R50, PLAUR, NME1, BMP5, CKM, CEBPE, ESR2, AGTR2, BHLHE41, MESP2, DNAI2, PZP, RBM28, CD3E, APRT, MEP1B, TP53RK, KCNJ8, ITIH4, TCOF1, SLC16A1, GJA5, SLC17A5, HGF, SOX18, SERPINA10, INSIG1, SYNGR1, CFD, ACSL4, PPM1D, NHLRC1, SOX2, CYP1B1, COMT, CACNA1G, AMER1, PDLIM5, XYLT1, GNPTG, ROS1, BRWD1, ZFAT, TRADD, AS3MT, SLC6A3, KRT75, SLC19A2, CD3EAP, C9, PVR, BEAN1, FANCG, DCAF17, ZNF224, AVP, TMPRSS11A, L3MBTL1, SCN3B, PGK1, OAT, CCL13, DRD1, IQGAP2, PLOD1, ANKS1A, SMNDC1, RYR3, PRCP, XPNPEP2, SPINK1, RNF135, PDE6A, NBAS, NDUFB1, SLC5A11, DHCR24, ADRA2C, NBN, ADAMTS18, SLC17A1, CYBA, SOS1, PLAU, RAC1, KMT2E, PTEN, ARSF, C1R, SLC28A3, ATP1A3, PNKP, SETD2, ROGDI, MATR3, TICAM1, CILP, PROZ, BTLA, SERPINB5, SEC23B, DCK, RFX5, SLC6A4, SPTLC1, CALR3, TOPBP1, PKP1, NDUFA6, KLF11, SYNE2, SLC22A4, SERPINA6, GALK1, FABP7, DPYSL2, FBXL6, SDCCAG8, KEL, CDK5RAP2, FSCN2, FTHL17, ADAACL2, NGF, GK, SLCO1B3, DSCR8, FLVCR1, PAX4, GIMAP8, CEP135, ALOX5, NR2F1, TRIM22, ACAD8, CDH13, NLRP3, GJA1, CCDC50, FASN, GNAI2, PHLPP2, RAB3GAP1, ASCC3, TGM2, ZNF202, POU3F4, DEFB1, GRM8, ARHGEF7, TBK1, PKD2, CRYM, NR1H3, SLC44A2, EPHA2, SQSTM1, AADAC, HPS6, PROK2, RPGRIP1, ACAT1, MTHFR, PTPN11, PHKA2, KDM5C, ATF3, TRDN, SNORD116-10, UCHL1, MPP7, POU1F1, NPHP1, FBN2, RTN4R, SYT2, PHF3, DNAAF3, GDF6, LCT, DICER1, APOC3, NPPB, CNOT4, IFNA2, PLA2G2A, FOLH1, SLC16A12, CASP10, ALK, GAN, PCMT1, HIST1H2AE, SRI, HLA-E, EVC2, TAF7L, YWHAE, ATP1B1, GON4L, NEUROG3, MGST3, BDNF, CDKN1B, LMBRD1, PNMT, LDLRAD4, SEMA3A, FOXC1, BTRC, STEAP3, EIF2B3, ACBD6,

HSPB3, ABCA1, FGG, SEMA3E, CSF1, PQBP1, TNFSF10, SMARCB1, MUC1, TAS1R3, MYO5B, C3AR1, ACOX1, USP24, KIF5B, MUC7, CSDE1, MYH9, CLPTM1, LBP, BDKRB2, HSD17B4, AICDA, DCLK1, TLR6, MEF2A, GPI, RAD9A, HTN3, TAF2, SLC4A3, ADORA2A, CDKN2B-AS1, STIM1, KCNH2, TBX2, FOXD3, TMEM237, IFITM5, CCHCR1, RPS3, RPS27A, ADCY5, GCM2, FKBP14, TNNI3, SGCB, IGFALS, NPAT, NR0B1, DUOX2, RASGRP2, PRKD3, CASP8, APOB, PIGR, CFH, TSC2, NRIP1, NRP2, FUT6, PTPRB, GJA8, FGF20, FLNC, KRT3, MOG, KRAS, SPTAN1, ERAP1, ATP7A, ITSN2, GIP, PSPN, C4A, HOXB13, PPARG, DSG2, BBS10, GYPE, SIGLEC14, PPP2R1B, APLNR, JAG1, CHGA, IRF6, MMAB, EVI5, CALCA, HTR3C, IFT80, ENAM, CXCL11, DLL1, TNNC1, AKR1C2, GNB1L, IL31RA, MYBL2, GFI1B, PPIG, C12orf10, MAPT, NAGA, MRE11A, HLA-DPB2, HOXD4, TTBK2, C8orf37, GJB3, HLA-DQB1, NRAS, MTTP, ECM1, SIX3, CHRN4, OGG1, NYX, HDAC9, EPB41L1, DYM, LITAF, TMEM165, AFP, MSX2, PHOX2B, MYT1, CPB2, CTF1, USP9X, TGM5, SLC34A1, NR3C1, FCN2, DLX6, NPAP1, F11, ATP2A1, ZC3HAV1, YY1, ZNF80, SLBP, MIR124-1, FBXW4, NBPFF1, WT1, TAS2R46, CCDC170, STEAP4, TXNRD2, HTR3B, TNFRSF4, CBLB, MIIP, SNAPC4, SLC22A11, HMX2, VAPB, IGHM, TAS2R19, FBLN1, GSTO2, MRRF, RP1, RAF1, INF2, ZIC1, PRPF6, KLRK1, LYST, FURIN, ADH7, P2RX5, NCR3, FKBPL, APOA5, CCR2, EDN3, BLM, GMIP, RIMS3, DRD2, UNC13D, SMAD7, SOX3, CFHR4, GATAD1, TMC8, FCER1A, FHL2, CALR, NUDT6, PHOX2A, KCNMB1, DES, S100A14, ASPA, FGFR2, XRCC3, GDAP1, GH2, BEST1, MMACHC, REV3L, PTK7, RBM20, PHKA1, PRKAR1A, HSD3B1, TNNI2, RAD52, RGS7, CD207, DISP1, RSPO1, FEM1A, CHUK, HR, PDPK1, GM2A, CPT1B, KYNU, SRGAP2, STK32A, PCDHB4, CD2AP, SMN2, PEX7, RPS26, STX11, CYP7B1, KCNC3, TBXAS1, STXBP5, HSF4, LOR, ARG1, KIF5A, PSENEN, OPTC, SPRED1, PCK1, HBD, NPR3, TRBV9, RAD51C, CNM4, CFC1, IRAK3, MYO5A, ADAM10, SULT2A1, PRPS1, GALC, LIPA, TMC1, CNTNAP4, CHST14, PPP2R2C, P2RY12, PNPLA1, SLC6A13, KANSL1, VWF, LHX8, MCHR1, VTN, TPM1, TBX1, CIDEA, ZNF644, MPHOSPH8, CYP2E1, FLNB, WDFY4, OPRL1, CTH, ATF5, SPTBN5, TAF1L, STK33, SLC01A2, LIG4, ECSIT, BMP4, VSIG4, OSTM1, CLCN7, AGTR1, MC1R, RNF168, OBSCN, CISD2, CLCA2, GBA, SLC52A3, DPY19L2, CYP2G1P, PPIA, CSNK1D, CCL4L1, NDOR1, TRIB1, PRKAG3, NT5C1B, KIR3DL1, TPRN, CD46, RALGDS, PTPRT, PER2, RNU4ATAC, RGR, CCKBR, DSG1, CCK, NDUFB6, ADRB2, CD3D, TBP, RPH3AL, CSMD1, CTSD, HPGD, NHEJ1, TRERF1, TUBB3, SLC24A2, IL3, MIR510, ANO7, GLI3, TP53BP1, PTCH1, ERCC3, COL25A1, AMACR, TFRC, TINF2, SLC7A10, AK2, VPS13A, CYP4A11, BCOR, CRYGB, AVPR2, GRIA3, CRISP2, RP2, NTRK3, SERPINF2, FMO1, PICK1, MIAT, SGCG, FBN1, DCDC2, C12orf57, FANCF, BEX4, TBL1Y, HYDIN, SLC10A2, PEX6, TMEM187, AIP, MCEE, TNFRSF13C, SLC6A14, MAP3K1, ALDOA, CTNNA3, GAB2, AP3B2, IQCB1, LAMA5, HNRNPH3, SKIV2L, DIS3L2, FREM2, TBX15, IL12A, PRB3, FUZ, DROSHA, BMPER, CCL2, RGS9BP, KPNA1, MIR125A, KRT81, RFXANK, SPATA7, ADA, LAMC1, EFHC2, PDCD10, EIF2AK3, CHMP4B, ACADS, MS4A6E, TROAP, EPHX2, ANXA5, ELOVL4, KRTAP1-1, ANGPT1, KARS, MED23, PTGDR2, CCDC8, VIPR2, PRLHR, HMGA2, EIF4G1, TMPRSS15, TRPM4, GJC3, ISYNA1, RAB39B, HSP90AA1, ICK, SEL1L, NDUFC2, ATP6V0A4, SLC4A10, PARP1, PLIN1, FGFR1, BAG6, LHX1, KRT2, RPS15, ITGA4, SEC23A, DNAJC6, CLOCK, DSG4, CPA6, NSUN2, JAG2, ROCK1, TGM1, SLC37A4, PTPRK, WDR81, AP5Z1, PRKCSH, ENG, ARHGAP31, KLF1, RXRG, SNORD116-1, SULT1E1, KDR, SORCS1, TBC1D4, GLUD1, GIT1, HPD, RPIA, PHIP, MYLIP, SLC11A2, NBEAL2, EPB41, TYROBP, MEN1, RMI1, IKBIP, ECM2,

NPHP4, TNC, MYD88, DOCK9, PML, BRAP, CFBF, EBAG9, UROD, RPL36, ASPM, LRP6, SERPINH1, AFF2, RFC2, ZDHHC8, PPARA, CD244, ZDHHC15, KRIT1, LEFTY2, MGLL, RORA, PTPRD, IL2RA, MYH15, CD24, CRX, MIR892B, KCNJ1, PRG4, ARHGAP9, UGT1A9, CRYAA, ATP1A2, BACE1, TNFSF4, TG, OPTN, ACADSB, BCL2L11, CABP4, HDX, PRSS12, SLC28A2, RBP4, SP100, IFNA17, MYO1A, BTC, PLCB1, RAI1, LAMB1, LOXL2, IGF2, PROK1, SERPINA7, CHRNA1, RPL21, PHF6, HOMER2, DNMT1, HTR1B, KCNS1, BRIP1, TRIM21, SBF2, CFI, ADRA2B, KIR2DL3, SLC7A5, FABP1, T, SORBS1, SLC15A1, NPC1L1, TAT, GSPT2, CRYGEP, LIFR, CBL, GSTT2B, GP9, DMBT1, KCNAB2, GSTK1, SPTLC2, ZDHHC9, CLCN5, TSEN2, SGCA, MAGI2, NLRP2, FLT3, NELL1, PCDH19, TSPO, ADORA1, HES6, UCP1, POLE2, FADD, FGF9, FOXA1, IL2, VNN1, CACNA1A, SPG21, CDH1, OSR1, GRIN1, ITPA, EMC4, EDA, CHRNA4, HSPA5, SERPINB6, TNFSF13B, CMPK1, SCN2A, WNT7A, UPK3A, FIP1L1, SSH1, RHOB, ENSA, H6PD, GNAQ, XPA, MMAA, PRB1, APOBEC3H, AMH, ZNF526, GNPTAB, IRF5, ACAT2, GNMT, HADH, TRPM1, PPP2R1A, CCKAR, TMEM173, COL2A1, ARL14EP, RPA1, TROVE2, IFI30, PLEKHM1, GLUL, MSX1, WNT10A, HK2, RDH12, MICB, EPHX1, SLC30A10, DLX3, AIMP1, AP4S1, SLC27A4, AVPR1A, GJB2, SOX8, ATXN8OS, ICAM1, MTHFS, ZNF674, BRSK2, CD19, SCARB2, SLC20A2, CRBN, STK4, SLC16A3, DLX5, ADK, CELSR1, TNNI3K, CHRND, THBS2, NEXN, CA2, FOXF1, TPO, LTF, TTI2, TAS1R1, ETS1, FGD1, AGRP, HSP90B1, SMOC1, TMEM138, GSTA3, HOXB6, USP26, CD81, MYH7, TCIRG1, SH2B3, CYP2W1, TMCO1, PARL, BICC1, TRRAP, RYR2, GRN, TRIM32, HOXA4, PTS, ADCY6, SLC36A2, DDC, NXF3, NPR2, PROM1, PRLR, ZFYVE26, GDF5, SNX3, CHIA, CATSPER3, TBX20, INMT, ADSL, FTSJ1, DST, BAP1, NPSR1, GLRX5, MSH2, LNX2, NPCC, ZEB2, CYLD, HIF1AN, ABCG5, BUB1B, MIR16-1, USF1, JMJD1C, SLC46A1, MTMR2, CHRM2, PRRC2A, NR1H4, RRM1, COX7A1, SALL4, PDE11A, CADM1, NOTCH4, ZCCHC8, CD5, ABCA4, OPRM1, MAT1A, CLYBL, CYP26B1, CALM3, APCDD1, RGS9, PCCA, CNKSR1, B4GALT7, AQP5, TSSK4, CEP41, SDHC, MPDZ, ATF6, GNB5, EYS, FMO2, IL16, ITIH1, MSTN, VCL, RNASEH2A, SERPINE1, CCDC88C, HFE, SMN1, BRWD3, VCAM1, EDARADD, PTAFR, PORCN, ROBO2, ALG3, CR2, GNA14, LPAR6, ZMYND11, MYH8, CDH23, PEX10, TTN, SLC26A5, RGS6, GALE, SRGAP3, NCALD, LMTK3, AKAP13, FLG, SLITRK1, ALS2CL, HHIP, RAD51, RAD51D, ADH1B, MEST, FERMT1, DYRK1A, HTRA2, SARDH, RANGRF, HBS1L, WISP3, CRK, KIAA0319, RNASET2, PKM, NEDD9, RPS7, JAK3, HSPA1B, FCER2, CXCL5, SPRR3, GSTO1, PITPNM3, ENPP1, SCNN1A, IDUA, KCNE2, P2RX4, CFB, UBIAD1, CDC42BPB, FCN3, SLC34A2, NPTN, NPY2R, SART3, CAPN10, FOXP1, CCR5, NDUFS5, SLC5A1, EPHB6, SYT14, PDLIM3, SCN8A, UNC93B1, RGMA, TJP2, KRT10, LILRA3, CCT5, RAB27A, CSF2RA, PEX19, PAX3, EYA4, RALGAPA1, YAP1, EDN2, PSMD7, ITPKC, ST8SIA2, RAD21, PPP1R3C, LMX1B, LRP4, SLC5A2, DLGAP2, MIF, PFN1, ORC6, IRF8, POMT2, CHRNA9, ITGB3, SPATA13, CEP152, CFHR3, BMPR1B, PDE8B, SF3B4, MAP7D3, LTC4S, SMARCA2, TUBGCP6, TLL1, ADAMTS10, COL10A1, BLOC1S6, NLGN4Y, BCL11A, F12, KDM5D, ACTA2, FANCE, FZD1, MKL1, ANKRD1, FREM1, SAA2, DDR1, PTGS1, ALDOB, LAMA4, DCC, FBXO18, TMEM185A, SYNPO, GUCA1A, UBE3C, CLIC2, KLF10, ASCL1, LTA, TTPA, IFNA10, MIR499A, MGEA5, UBR7, PVT1, CYP46A1, BCAT1, PARD3B, SLC2A9, CHN1, RAG2, HGSNAT, PMM2, HMGA1, KRT85, SLC14A1, CA1, RANBP2, DCP1B, LIG3, SERPINI2, IRAK4, KCNJ15, ECI1, DHODH, TULP3, ATP2A2, MLPH, ATIC, CXCL16, ATOH7, NRG1, NPL, CAST, TGFB1, SLC4A11, SNAI2, DGCR2, MARVELD2, CISH, JPH3, SPINT2, CYP2J2, CASK, HSPG2, APOL3, FLNA, BAX, CP, LRPAP1, SLC17A8, G6PC3, CYP24A1,

		<p>SMARCAL1, ANO6, NPAS3, PRMT7, AHSP, USH1C, DNAH5, CTC1, GHSR, ATP8B1, CLN3, TRPC3, SEMA4C, FMN2, TUBB1, SCN5A, FANCB, KAT6B, FBXO10, PDGFC, TP63, PEPD, ANXA11, VHL, CSF2RB, LMBR1, ZBPB, RPS6KA3, FGF23, NLRP14, PNPLA2, PCNT, BCKDHB, GALNTL5, PAH, PTCH2, ERCC2, VPS13B, DCLRE1C, HBG1, PSMB9, CYP2R1, HCLS1, CSF2, GHRH, IL11RA, RPS6KB1, GDF3, MMP9, POLR3B, RXFP2, HBA1, CTSC, AQP7, ADIPOQ, MPST</p>
Mitochondrial genes* <u>AND</u> TruSight expanded†	33	<p>PNPT1, SUGCT, ATP5A1, ATP5G3, TARS2, SFXN4, LYRM7, FBXL4, RMND1, UQCRC2, SLC25A1, COA6, COX20, VARS2, COQ8A, SERAC1, COQ8B, LYRM4, CLPP, TRAP1, OGDH, MICU1, COX7B, CA5A, DNA2, IBA57, APOPT1, MPC1, CYC1, MRPL44, MGME1, IARS2, SLC52A2</p>
TruSight expanded† (not overlapping)	1933	<p>DPM2, FSTL1, CREB3L1, RIT2, SLMAP, FEZF1, SAMD4A, ITGA5, APBB2, ECHS1, NAPRT, PBX4, LRRC41, HOMEZ, DDB1, C12orf66, KCNA6, ATP5G2, ERG, FAT4, PARN, LRMDA, KCNK3, PDE1C, SEMA4D, MREG, HEPH, AK7, PIR, IGSF3, LONP1, ARL6IP1, CHD1, C15orf41, WDR34, GLRA4, OR10X1, KIAA1210, GEN1, UNC45B, BMP3, SLK, BAZ1B, CCDC66, PPP1R15B, LRGUK, SLC25A46, LARP7, ELOA3D, RNF32, HES1, RAB33B, CIAO1, KCNC1, C2CD3, TNFRSF9, CCNE1, FOXM1, FBXO31, FBXO11, ST8SIA4, CDK8, EMC1, ORM1, POLR2B, B3GNT7, RPS28, TUBB, PLXNA1, RFX3, CRELD2, CD82, VAX2, SETDB1, KLHL41, GMPPA, OR4M2, HPCA, MLF1, FCN1, CLCN4, RNF39, DNAL4, IPP, POLR2J, UQCRC1, ZBTB11, CEP120, ADAM23, B3GALT5, SPTBN1, RICTOR, GRXCR2, RHOH, GNA11, ARSH, TACR1, CAPN1, DDHD2, UNC13B, MYO5C, SARS, SLX1A, LAMB4, PRDX4, KRT71, DAPP1, CNTN2, CAPN12, ECEL1, EPHA4, KCNQ5, C21orf59, ZBTB20, SELENOP, WASHC5, CENPX, LTBR, GNB4, ANKLE2, SLC9A3, AGTPBP1, SLC39A5, FKBP4, HCFC1, KIF14, SCN11A, SMC6, RTN4RL1, EIF4A3, DLEC1, KCNA4, ARID5A, UBE2N, IGSF8, ACAD11, LMO4, TRAF7, HUS1, DNAJC30, HID1, POLD2, RTEL1, FSTL5, PDAP1, BRD4, ARFRP1, KLHL6, CASC4, PCDHGB4, PDGFRB, DTNB, rs6841061, SLC4A5, HOXB8, ITSN1, SVIL, PHB2, TNKS2, DUX4L3, NDUFB8, CADPS2, MYF5, GRHL1, DLST, FST, ZNF419, MTMR12, ABCC12, FAM177A1, GSDME, TANC2, KIF4A, TFE3, OVCH2, TMEM189, LGR5, DCAF11, LRP1B, SULT1C3, TLX1, OR2M2, BDP1, RPS29, OR8K3, KMT5A, TRIM63, PLRG1, BCL7A, PARD6G, INPP5B, FAM71A, CLIP2, ERMARD, PARP4, NCK2, OXA1L, SC5D, CEP164, E2F4, TAL2, HPCAL4, NFAT5, NUB1, rs8045964, DVL1, FLI1, MAB21L2, MELK, PODXL, CLIC5, HBQ1, ARHGAP26, CDK16, JAGN1, KRTAP4-8, SPATA32, MAP3K6, SDR39U1, PPP6R2, PGBD3, DMBX1, AREG, LIPT1, AP2S1, KANK4, ZNF713, SGO1, SGSM3, NR4A3, DNAAF5, MUS81, AGBL1, OR1B1, CHPF2, FGF22, C21orf2, RPL27, NLRP9, NIPA2, MAGI1, BGN, PJVK, RDH11, PIGT, FOXO1, KIF5C, MATN4, SMIM1, PPP1R17, PIAS1, CDH20, ST6GALNAC3, PPP4R1, ZMYND10, WNT16, STYXL1, SLIT1, DMAC2, ADCY1, TCTN3, TRIM24, PLXNA4, GBA2, SYN2, KIF23, SEPT7, ADGRG1, ZDHHC17, KCNH1, HFM1, SPEG, PTPN23, HIST1H4B, FAM3C, KCNH3, AP1S3, SLC12A7, MDC1, PRKN, PYCR3, ATP11B, TELO2, RINT1, NRN1, DNAH7, DUSP3, RAD23A, IFT172, CTNNA1, SCAMP4, NDUFB7, DCAF4, SPANXN1, OR8H1, ACR, RAD9B, PADI4, AK8, BIVM, NDST3, KLHL15, GALNT6, SNX5, RASGEF1B, NCAM2, PACS1, NR4A1, PURA, RPL15, TRAPPC11, NEO1, MELTF, RASA2, STAG1, NECTIN4, DHX38, UFD1, CFAP53, CLPTM1L, EML4, ATP6V0C, NOX3, ARHGEF4, C2orf80, SZT2, ARHGAP29, FBLN2, PPP2R2A, SCLT1, CAMSAP2, ABL1, ZNF433, LY6G6F, MKL2, DAXX, SLC24A4, rs10748087, GAL3ST4, WDR27, PKHD1L1, MCC, IFT88, P2RX2, NME5, CHMP1A, CCDC85C, MESP1, MTA1, BPIFA3, CLCN3, GNG7, POLR2A, MECOM, POLE, TSPEAR, CAMTA2, SCN7A, TRMT10A,</p>

NLRP8, MCF2, CKAP2L, POLR2J3, C16orf58, DDHD1, PPP6R3, BICD2, LRR1Q1, TCL1B, FGF13, PPP4R2, KCNV1, ACP1, ZMYM2, B3GNT6, KIAA1586, KIZ, TGM4, FAT1, MGAT3, SIM2, GTF2H2C, CELSR2, DOK5, PTRH2, ZNF668, STAMBP, CRYL1, NEXMIF, PPM1G, KCNC2, SNX8, CDH19, TAAR1, SELENON, HDAC1, ELMOD3, RNMT, PROX2, MYH4, FAM46C, DCHS1, SYCE2, CXCR6, TPPP, UST, UBE2V1, MBOAT7, ST6GAL1, ATP2B3, PYGO1, RAB10, ANO3, HIBADH, DEK, CRTC1, UPF2, LMO1, DNNT, SUCLG2, JMJD7-PLA2G4B, AMPD2, ACTN1, MRPL36, SPRED2, BBIP1, ELOB, POU3F3, KCTD3, GULOP, NKX2-2, LRIT3, C14orf2, KCNMB4, PYCR2, DOCK7, ABCA5, PDK3, GAGE8, BICRA, TNPO2, IRF9, LBH, MYO1D, UGT8, POMGNT2, HINT1, OR52N4, RPL38, PRCC, CHPF, RFC5, MAP7D1, IGKV1-5, CYR61, rs4411641, MYBBP1A, EHHADH, USP8, LAPTM4B, NEK2, WDR73, VWA3B, NDUFA5, UQCRH, PGBD4, ACKR3, MAEA, ISCA2, RDM1, ST6GALNAC1, HMGB1, EIF2D, CBFA2T3, RAP1GDS1, PLXNA3, CDC25A, FZR1, DPH1, MMS19, ESPL1, ST8SIA5, B3GNT5, USP30, MAP4, UGCG, STT3A, QARS, SOX7, ARV1, COX5A, MACF1, WWC2, SEC24D, POLR2L, EPB41L4A, MNAT1, ZDHHC2, TAF4B, MTA2, SLTM, RAP1A, MALT1, LZTR1, KANSL2, ZNF783, FCRL6, HOXC13, METTL23, SMARCC2, RECQL, NLRC4, POLI, SMARCC1, CLHC1, UCN, GNAI3, SPATA5L1, RAD51B, MMRN2, SOX4, DUSP22, SLX1B, C18orf8, ZNF347, ST6GALNAC5, GPNMB, TTF2, SFPQ, KCNT1, PTPN12, ABL2, CRYZL1, CRY2, PTPRZ1, GPR137B, TOP3B, RXRA, STAG2, MAML2, NFATC1, SSX2, INTU, EML1, CDK12, PLCG1, MEPE, SLC16A7, GALNT13, SPO11, NEDD4, DCBLD2, ZBTB38, CFAP57, SLC25A5, PI4KA, MRPL12, NLRP6, TIPARP, PGAP2, CHEK1, NEIL3, RTN3, ZNF175, MRAP2, MAP3K14, PPP1R8, PIBF1, PDE6D, TLL1, PRKG2, CCSER1, PPP6R1, SPRTN, SUPT5H, SOS2, APOL4, LARS, ANKRD28, GRK3, GALNT5, PLXNB1, ALG14, ARHGAP45, STAT4, FAT2, rs6512586, ZNF311, PRMT2, ITGA1, ECE2, GTPBP3, TCF12, ACTRT1, SLC7A14, ITGA8, DCLRE1B, PRKCD, NDUFB4, SYNE4, rs6666954, SLC12A2, RIPK2, DNAH1, ZIC4, ZFP36L2, PPP4R3B, CST9, PCLO, ZNF778, USP54, RNF2, MTF1, SCNN1D, NOL3, NLRP13, POLA1, ASPH, RRAS2, PITPNA, UBR5, STUB1, KDM1A, CRYBA2, LEF1, MAPK14, ADAMTS19, KIAA1217, EIF2S3, ENDOV, TMEM47, CDH18, RAPGEF1, MAP3K8, DLG4, STOM, OR1J1, CWF19L1, PRLH, VEGFC, BOLA2, ITGB6, KCNK17, CAR5, EXOC8, SUPT3H, TTC5, TEX28, SHANK1, PDK2, LIN7A, PPP2R5C, OOE, ST3GAL6, IL34, ZSCAN29, TNK2, NPAS4, TBC1D20, CEP83, LUZP4, SIPA1L1, GPRC5A, CDC42, UACA, SETD5, RBX1, COL4A3BP, SEMA7A, TUB, GTF2H4, WDR60, GRHL3, GABRA2, ZSWIM6, MYL1, TNFSF18, PCGF2, CCDC127, PLCD4, RBL2, USP53, E2F5, OR5AC2, U2AF1, SLC4A7, TTC7A, RPL6, ITPR2, PLK4, CCNT2, KEAP1, RFC4, H2AFX, ELMOD2, KAT2A, B3GLCT, CPQ, BUB1, PIEZO1, POLQ, SOAT1, HCN3, SLITRK6, ATL3, EXOSC8, EHBP1, B4GAT1, ATAD3A, TXNIP, TRIP13, CAMK2G, POLR2D, STAG3, PSTPIP2, ISG15, ZMYM3, TGDS, ELOC, PRAMEF2, CLK1, TNFAIP1, WDR31, BCO1, CPA1, FOXP4, WASHC4, GFM2, RPL26, NDUFB10, RGS5, OPLAH, TUBA4A, CLSTN1, EEF2, MOV10, PRPF4, B3GNT8, FDX1L, ATP6V1B2, ARHGAP18, PTPRN2, CYP26C1, DUSP6, GMPPB, PIMREG, HIVEP2, BEND2, NUCB2, B3GNT4, MTA3, ID4, C11orf40, FAM136A, AKAP1, GAL3ST2, ANOS1, POLR2K, SASS6, RREB1, TBC1D30, NME7, TFDP1, MND1, APOBEC1, SLITRK5, NDST2, TNPO3, LARGE1, TSR2, MBNL1, SYK, HNRNPDL, NECTIN3, TDG, TBR1, PLAG1, FOS, MYCBP2, CYP2D7, CCDC65, XPO1, CAVIN4, PAMR1, CCDC33, EPHA6, FCGR2C, RRM2, NGLY1, CST6, TOP2A, CX3CL1, FAR1, PGAP3, ODAPH, SF3B1, TSG101, ATRIP, NAV1, AEBP1, PSMA7, DBF4B, TUBG1, PCDHB16, IL6ST, PPP4R3A, TEC, CDKN2AIP, APCS, PAK5, CHD4, IKBKE, MRPL40, ACAD10, WNK3,

DUT, LYL1, ADH1A, C21orf91, ANGPTL6, TUSC1, DYNC111, PPP4C, NFATC2, TREH, KMT2A, RIT1, ERF, SLC12A5, ARL3, MLLT10, COX5B, TMEM121, EIF2AK4, THOC6, TMC3, OTOGL, C7orf43, MSRA, XG, SYNPR, NSMCE3, CEP126, AZIN2, IMPG1, ZNF517, UBQLN1, PPP2R5D, EXTL1, XKR6, WDR5, ATP13A5, FAAP100, RNF219, ST6GALNAC2, ACMSD, DTHD1, CIZ1, WWTR1, RNF212, CBY1, TLE6, SLC35A3, ABRAXAS1, SYNJ1, PCDHA1, SNX1, JAK1, PARP3, ZFR, GALNT11, MFSD4B, ACSL6, CHAF1B, NDUFA3, FLOT1, ULK2, NRCAM, KCNB1, DESI2, SHARPIN, RNF125, rs11130795, CUEDC1, STARD9, GPRIN3, PCSK5, POLR2C, CUX1, ZNF77, TBCK, MARS, RARS, PIGW, SAE1, RSC1A1, ZFP69, FOXD1, IL11, RLIM, FOXD4, ARID4B, GMDS, UBE2V2, BOLA1, ADAM22, CDC5L, APLF, AHNAK2, WNT9B, FAM120B, ADGRV1, MFHAS1, SSBP1, PDIA4, GTF2H3, EOGT, B3GALT1, RBM43, PAM16, DDX3X, KIF3C, SCG5, WAC, USP44, WHRN, PPP4R4, CELF4, SFRP1, CDKAL1, ST8SIA6, VAV3, RMI2, TDP2, STXBP3, DAAM1, MIB1, ADD2, CNTN6, LRIG2, USP1, HCAR1, ZNF420, RBL1, SLC25A43, SMAD5, rs1393978, CDX1, ATRN, DPCD, HAPLN1, NADK2, ARNT2, KCTD1, SPOCK1, SPEF2, DCAF8, ZNF638, CEP250, DLG1, POLR2G, CNTNAP1, KPNA7, APOL2, RNF38, FYB2, AHDC1, GLTP, ITPK1, POLK, GNAL, UBB, TRIM33, PAPOLA, TOP3A, NDUFAB1, COX6C, MS4A10, RPS5, B3GAT1, PUF60, DARS, ELOVL5, EPS8, B4GALNT1, DAD1, LIMS2, SMO, GPC5, MCUB, TMEM240, ZMYND15, CECR2, ANLN, PRR16, PPP3CA, KATNB1, BCLAF1, ALKBH2, FOXJ1, TRA2B, CLEC4E, MGAT4B, RTF1, GTF2H2, FGF17, RBPJ, DAPK3, LMOD3, EMP2, POLE3, PRDM16, TMEM98, FRMD5, ULK4, TRIM2, OTUD4, PPM1K, NFKB2, ELOA2, DENND1A, TMEM99, SLC6A6, ATP1B4, RAB3A, ABRAXAS2, BARX2, NLRP10, NLRP5, TMEM92, EDRF1, RAD18, RANBP6, CRIPT, DEPDC5, RGL1, NKAIN3, FAAP24, ZNF395, RASSF5, ATAD3B, IKZF3, FAM47B, SLC25A21, ARIH1, LGI4, MFAP5, NTAN1, C12orf4, rs37535, MOB4, CLEC3B, NDUFC1, ARL2BP, KIF2A, ZNF79, ARL6IP6, RARB, CCDC18, COG3, MAFA, CBFA2T2, UGT2B4, NAALADL2, UTP14C, FUBP1, CT45A2, TNFSF12, PBX1, ALPP, ASH1L, RDH8, PHACTR1, GPR132, ATP1A1, MTSS1L, PLXNB3, ACVR2A, ANKRD52, MYOD1, SLC39A12, GNAO1, PFKL, TEX13B, AURKB, FAM189B, PRPF39, PROX1, rs6074704, TIPIN, CCDC6, SLC17A9, TOR1AIP1, FOXL1, ADGRG4, BCKDK, CGB3, PFKFB1, POC1A, RAD1, NTM, PHYKPL, GDF2, PCBP3, CHAMP1, TM4SF20, GALNT17, OR13H1, LARGE2, HAGH, VSIG1, CNDP2, ITGB1, BVES, DSTYK, CSPP1, CYB5R4, LRBA, LMAN2L, C1GALT1C1, DSE, FHIT, NFKBIZ, CREB3, ZNF157, GRIA1, SPDL1, FAM81B, ASPSCR1, CCDC90B, MAP1A, EME2, WNT9A, HAS2, CD200, MARCH3, RUNX1T1, DKK4, SMCHD1, RRAS, ZFPL1, BCAS2, FMOD, LUZP2, KCNAB1, BMS1, MXRA5, BPIFB6, NFATC3, POFUT2, GNG2, SELENOS, BCL6, GAL3ST1, MDH2, TXNL4A, RAB25, CRAT, SLC7A11, ZNF780B, VPS53, SPERT, NAA15, BLOC1S5, ASB1, MCTP2, TMEM5, CERS3, PLS3, FIGN, RPL24, PWWP2A, FAM120AOS, ARID2, CALM2, GYG2, PARS2, CTSF, GNA13, B4GALT4, FBXO25, PDK4, GFRA2, NNMT, POLD4, EPHB1, DLL4, UBE2T, POGLUT1, SMARCA1, RECQL5, SSR4, NR2F2, FHOD3, PRDM1, TNRC6B, RERE, PTDSS1, CACNA2D2, FKBP8, POT1, KIAA1109, COX6A1, B3GALT2, CCT7, EEF1A2, rs9388856, HACD1, HERC1, FAM111A, SLA2, HOXB1, INPP5K, CASQ1, INPPL1, BUB3, VIL1, CCDC107, CDC27, CNN2, WNT1, DBP, ZC4H2, KDM5B, ME2, H3F3A, rs12682834, NECTIN1, CGNL1, CLEC4D, ZNF44, EFNA5, NXN, ADA2, IGF2BP2, CENPE, ZIC5, CYP3A7-CYP3A51P, CNTLN, METTL14, SASH1, IL17RD, PHC1, PRAG1, ELOA, NGEF, ZNF582, STK36, MAPK1, HNRNPA2B1, RNF216, GADD45A, SBF1, POSTN, RCHY1, PPP3R1, TACC3, UGGT2, SEM1, DMXL2, STIM2, UBE3B, IQCE, PPP2R5B, SPOP,

OSGIN1, LINS1, IKBKB, TCL1A, ENOX1, DOK1, B4GALNT3, PGAP1, NECAP1, POLR2F, ST6GALNAC4, DCLRE1A, RIOK2, PDLIM4, CCNQ, CCPG1, DCBLD1, P3H2, VPS37A, CFL1, OR10V1, PIGQ, NISCH, TENM3, LINGO2, ZNF408, AMBN, CEMIP, SLC35A2, CD74, CTPS1, SYNCRIP, ESS2, KCNJ12, ATP5J, NLRP11, CHRNB3, PID1, TAAR2, RFC1, TRNT1, KIF1BP, MAP2K7, ANKRD44, KIF27, TMEM38B, SMPD3, NFE2L1, GRID2, ZNF423, CHST7, TBX18, RGL2, UTP6, SUZ12, EXTL2, MACC1, CEP19, ELOA3, WWC3, GALNT14, RAB34, TRIM28, POLE4, FGF5, IFNL4, GUCY2F, ERLIN1, CHCHD10, ST3GAL4, DCPS, NFS1, CRMP1, TIMELESS, NUP107, DDX10, MAPRE2, CSNK1G1, RPA3, NLRP4, FGF16, IFT27, DDX59, FLRT3, SEZ6L, NDUFB11, OSBPL2, TBC1D7, VPS54, PRMT9, KANK2, SPP2, ALDH1A3, SPAG1, PPP6C, PRIMPOL, SUCO, GTF2I, KCNN2, BRD2, DGKE, DNAH3, SSPN, SPSB1, ALG5, MESD, DOK2, GALNT8, WDR48, DCAKD, TRAK1, FSBP, EIF4H, DLC1, ACP6, SPRY4, RORC, BOC, MANSC1, STX1B, KPTN, FBXO38, LDB1, HDGFL2, GABBR2, RNF8, SLC05A1, FCER1G, SNTB1, APEX2, SHOX2, RAD54L2, CPT1C, ARMC5, UBTF, POLD3, TXLNB, POU2F1, COX7C, ERFFI1, MLLT11, ELK3, FAM111B, B4GALT5, TTLL5, MMP19, FBXO28, CLEC10A, INO80, HAP1, B4GALNT2, COL27A1, CCDC78, KDSR, MCM8, OLIG2, LACTB, MID2, CCDC148, ANKS3, PCSK7, HNRNPA1, ZC3H12B, OTOG, ERCC6L2, EPHB4, REEP2, ERC1, VPS45, USP27X, APC2, SLC6A17, STT3B, ZBTB17, B3GNT2, FNBP1, S1PR3, ABHD1, ACTR3C, CDYL, OR52H1, CLPB, ZPLD1, PRTG, TLX3, RCBTB1, SEPT14, FAN1, MED20, DGAT2L6, CTNND2, ANXA1, GUCY1A3, RBFOX3, UTP4, UGGT1, KRTAP9-3, PLCB2, TIA1, HLTF, HMGB3, HMG20B, NUP214, MAGEC3, PRAM1, GPR101, B4GALNT4, RC3H1, MDGA2, RFC3, NSD2, MRI1, CROCC, SMIM3, SLC22A18, MANBAL, PIGZ, RMDN2, CLCN6, CYP2U1, SEPT5, MEOX1, DACH1, CMIP, CARD11, ATP5I, APOL6, PLK1, DAB1, ST3GAL1, DDX47, P3H1, DVL2, DPP4, ZNF141, IKZF1, SLC26A8, HIST2H4A, SNTG1, KCNA2, PCYT1A, XIRP1, THOC2, CYFIP1, COL15A1, CACHD1, EXOC6B, VAMP1, FRRS1L, RIC1, ARNT, MARK1, UBA7, PRPF19, RPA2, REST, CEP170B, MGAT5, IGSF1, FEM1B, TLX2, POLM, ATP5B, POLR2I, NUDT7, rs2988039, NDST4, TSEN15, SDHAF3, CELF6, COL21A1, E2F1, CLP1, CDC25C, CDH2, ACP2, COX7B2, PRAF2, CDX2, LRRC69, TENM2, CAVIN1, MTMR8, TANC1, CACNA1B, SERPINB7, TRH, SLC1A5, ANKS6, C15orf62, CACNG4, ZNF407, SUN1, RPSA, ZP1, STBD1, CXCL8, MGAT5B, DNAJC3, HOXA3, CRY1, PBRM1, RNF20, PIM1, BRF1, FSTL4, PAXIP1, COG2, PNLIP, CDCA7L, MTOR, KCNB2, TENM1, SNRPE, C4orf19, SLC27A1, OAS3, CDK6, P2RY1, RAB27B, SNAP25, KLLN, ZXDA, LRRC29, MYOF, TMTC3, LCK, AFF4, DEFB124, CRB2, UQCRFS1, ST8SIA1, CLDN23, SELENOF, RSPH1, NALCN, KCNE5, SMOX, COPS2, RHBDD2, NCAPG2, PCNA, LMO2, PDPR, B4GALT6, DOLPP1, B4GALT2, SLC38A8, MYCT1, ETV4, CENPS, ALDH1B1, POMK, ARMC4, NICN1, BABAM1, MEGF8, REV1, TRMT44, SALL2, DHTKD1, CRIM1, rs2583136, TULP4, GABARAPL1, IL15, TECPR2, PLEKHA1, LAT2, PKNOX1, NSD3, ABCB5, GALNT7, MAN2A1, SPECC1, VDAC1, TJP1, ZNF599, OR5H6, DEF6, JCAD, LRRTM1, TADA2A, KAT6A, GOPC, SLC35F3, TYRO3, SNX14, CUX2, CCDC151, EXOSC5, CEP89, COA1, CCDC62, ZNF292, ARNTL, RAPGEF4, ZNF813, CTCF, COASY, CCND3, DOT1L, CLASP2, PDE1A, PBX3, TFG, CCDC114, FOXK1, ADGRA2, EMX1, B3GAT2, ANGPT2, THSD7B, DYRK1B, DUOX1, EIF4B, C2CD5, PSMA4, ARSI, STK11IP, ZNF45, ZBTB42, CCNO, ST3GAL2, OGT, CAMKMT, PDGFRL, ASXL3, TREX2, MFAP4, SCAPER, DENND5A, RARA, SS18, TAF6, DLG2, PPP1R12B, DPP3, TUBB2A, DAB2, RBCK1, STARD6, NCKAP5, PLXNA2, MN1, STXBP5L, GPR37, EBF4, OR2J3, CSTF2, DRC1, INHBA, ATP5O, KNL1, DYNAP, DENR, CD80,

		<p>DDRGK1, KLF8, EPB41L2, PIWIL4, RAP1B, ADAMTS1, PRKG1, RASGRP1, ELAVL4, CDH9, PPM1B, NFIB, MBD6, CAPRIN1, ACKR1, GUCY1A2, FNBP4, SLC35D3, MXI1, SBK3, EXPH5, MAG, SERPINB4, KMT5B, ZNF451, RTTN, NIN, DDIT3, GPR152, GALNTL6, MCM9, CYS1, JUNB, ZKSCAN5, CACNG3, TET2, EPG5, PTH2R, RAB29, ST8SIA3, MDK, PRKD1, MICALCL, CALCRL, SLC22A25, BCL2L1, MAPK3, JARID2, USP34, KIAA1549, CHIC2, MICAL3, SSX1, SLC9A1, GATA5, SORD, ST6GAL2, KIF1C, TMEM231, CABP2, POLN, SEMA3D, AP3D1, PRKACG, SERHL2, KLHL40, FGFR1OP, MINDY2, HSF1, LAS1L, FAT3, POLR2H, PET100, PCDHA3, DSG3, MGAT4A, STK35, DKK1, CCNH, AAGAB, CAPN5, KCNH5, MRPS2, RAD17, INPP5D, ARID4A, ST6GALNAC6, LECT2, SRSF2, TCF3, B4GALT3, SMC5, SLC13A5, BACH1, STAT2, ACTG2, REL, EWSR1, CHR1, LRRFIP2, KLC1, NT5C2, PDK1, IFNA1, MTSS1, CDK5, PADI6, HMMR, CUL2, HEY2, GCG, ARHGDI, HDHD5, CDK19, AUP1, CETN2, UNC13C, CCND2, CUL4A, PCP4, RIMS2, SYT17, PLD3, SLC6A9, POFUT1, CHSY3, EFCAB13, RTL4, NNT, ALG10, SIK3, SNRNP, ELP1, SS18L1, TIMM21, BCL3, SOX11, C3orf35, DUSP15, CLIP1, ATP5C1, C2orf42, SEMA5A, C1orf127, FAM9C, HEPACAM2, NUMA1, STAC3, CPXCR1, CCDC198, GMPS, GPT2, RIPOR2, TRIT1, CTNNA2, NUDT15, RBFA, ARAF, B3GALNT2, IFNB1, ING1, ETV6, GATAD2B, CRYGA, CCL3, ALKBH3, NANOS1, KDM3A, RPS14, APBB1IP, TBC1D9, LGR4, PGM3, MYH7B, DNAAF4, ZMYM6, ZNF683, ADGRA3, ZNF33A, RNF128, GCNT1, OR51G1, NCOA4, POC1B, FKBP1A, AMD1, PRKCA, TRIB2, COL6A6, TNS2, MAT2A, TUBB4A, RNF6, BOLA2B, WDR93, RUBCN, GRIA2, WDR66, DAZ4, RETREG1, PHF21A, ATP5G1, DNAJC13, USP3, FLRT1, HDAC6, SPART, PLSCR3, XPO5, TOP1, RPS27</p>
TruSight one‡ (not overlapping)	78	<p>GPR98, FAM134B, KIAA1199, KIAA1033, SGK110, WHSC1, PTRF, SPG20, SUV420H1, WDR65, IL8, MFI2, PARK2, GYLTL1B, IKBKAP, HMHA1, PAK7, CGB, KIAA1377, VIMP, GPR56, DGCR14, CIRH1A, KIAA1462, KIAA1432, KIAA1279, KIAA2022, RAB7L1, MURC, DFNB59, LEPRE1, UFD1L, KIAA0196, LINS, GTDC2, DFNB31, DARC, DFNA5, BCMO1, SHFM1, DYX1C1, FAM58A, SEPN1, PYCRL, C10orf11, MESDC2, CYP2D7P1, SETD8, ADC, SEPT15, HSN2, IGKV, PRSS2, PRMT10, C10orf137, KAL1, KIAA0226, DYX1C1-CCPG1, LEPREL1, HEATR2, PVRL4, PVRL1, CYP3A5P1, LARGE, KCNE1L, B3GNT1, B3GALTL, C7orf10, ATP5SL, SGK223, SEPP1, GLTSCR1, CASC5, ADCK3, NAPRT1, SC5DL, PVRL3, ADRBK2</p>

* Mitochondrial Nuclear Gene list (mayocliniclabs.com): AARS2, AASS, ABAT, ABCB7, ACACA, ACAD9, ACO2, AFG3L2, AGK, AIFM1, ALDH3A2, AMPD1, APOPT1, APTX, ATP5A1, ATP5E, ATP5G3, ATPAF2, AUH, BCS1L, BOLA3, C12orf65, CA5A, CHAT, CLPP, COA5, COA6, COQ2, COQ4, COQ6, COQ8A (ADCK3), COQ8B (ADCK4), COQ9, COX10, COX14, COX15, COX20, COX4I2, COX6B1, COX7B, CYC1, D2HGDH, DARS2, DGUOK, DLAT, DLD, DNA2, DNAJC19, DNMI1L, EARS2, ELAC2, ETFA, ETFB, ETFDH, ETHE1, FARS2, FASTKD2, FBXL4, FH, FOXRED1, FXN, GAMT, GARS, GCDH, GFER, GFM1, HARS2, HIBCH, IARS2, IBA57, IDH2, ISCU, L2HGDH, LARS2, LIAS, LRPPRC, LYRM4, LYRM7, MARS2, MGME1, MICU1, MPC1, MPV17, MRPL3, MRPL44, MRPS16, MRPS22, MTFMT, MTO1, MTPAP, NDUFA1, NDUFA2, NDUFA9, NDUFA10, NDUFA11, NDUFA12, NDUFAF1, NDUFAF2, NDUFAF3, NDUFAF4, NDUFAF5, NDUFAF6, NDUFB3, NDUFB9, NDUFS1, NDUFS2, NDUFS3, NDUFS4, NDUFS6, NDUFS7, NDUFS8, NDUFV1, NDUFV2, NFU1, NUBPL, OGDH, OPA1, OPA3, OXCT1, PANK2, PC, PCK2, PDHA1, PDHB, PDHX, PDP1, PDSS1, PDSS2, PNKD, PNPT1, POLG, POLG2, PUS1, RARS2, RMND1, RRM2B, SACS, SARS2, SCO1, SCO2, SDHAF1, SERAC1, SFXN4, SLC19A3, SLC25A1, SLC25A3, SLC25A4, SLC25A12, SLC25A19, SLC52A2, SUCLA2, SUCLG1, SUGCT, SURF1, TACO1, TARS2, TAZ, TIMM8A, TIMM44, TK2, TMEM126A, TMEM70, TPK1, TRAP1, TRMU, TSFM, TTC19, TUFM, TWNK (C10orf2), TYMP, UQCRB, UQCRC2, UQCRCQ, VARS2, XPNPEP3, YARS2.

† TruSight expanded: <https://emea.support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/downloads/productfiles/trusight/trusight-one-expanded-gene-list-v3.zip>

‡ TruSight one: <https://emea.support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/downloads/productfiles/trusight/trusight-one-gene-list-may-2014.zip>

4 Partie 4 : Les altérations de l'expression et des modifications post-transcriptionnelles des enzymes impliquées dans le métabolisme énergétique et celui des acides aminés contribuent à la variabilité clinique et métabolique des erreurs innées du métabolisme de la cobalamine de type *cbIC/epi-cbIC*

4.1 Conséquences cellulaires d'un défaut de vitamine B₁₂

4.1.1 Généralités

La grande diversité des manifestations cliniques des erreurs innées du métabolisme de la vitamine B₁₂ trouve en partie son explication dans la complexité du métabolisme intracellulaire de la vitamine B₁₂ (35), comme nous avons pu l'exposer dans la partie I de ce travail. De plus, un déficit en vitamine B₁₂ a des effets sur la prolifération ainsi que sur la différenciation cellulaire ou tissulaire, et sur la réponse au stress via différentes voies métaboliques. Dans les modèles animaux et cellulaires de déficit en vitamine B₁₂, il est observé un stress du réticulum endoplasmique. Celui-ci est consécutif à une hyperacétylation de HSF1, elle-même due à une altération de la voie SIRT1 par une localisation aberrante des protéines de liaison aux ARN ou « RNA Binding Protein » (RBP) et donc des ARNm par altération de la méthylation et de la phosphorylation d'HuR, HnRNPA1 ou RBM10 (210, 316, 317).

4.1.2 Un déficit en vitamine B₁₂ responsable d'un stress oxydant

4.1.2.1 Généralités sur le stress oxydant

Le stress oxydatif – ou stress oxydant – est un type d'agression de la cellule, secondaire à la formation de radicaux oxygénés (ROS, reactive oxygen species). Ces molécules, très instables, sont cytotoxiques puisqu'elles peuvent oxyder d'autres molécules en leur soustrayant un électron. En situation physiologique, il existe une synthèse naturelle de ROS, contre laquelle la cellule possède plusieurs lignes de défense : des enzymes de type oxydoréductases, des molécules antioxydantes et le système de réparation de l'ADN. Il existe un état d'équilibre, préservé par différentes voies de signalisation. Le stress oxydant survient quand la quantité de ROS dépasse les capacités tampons de la cellule (318, 319), malgré l'aide de divers antioxydants exogènes tels que le sélénium, les vitamines C et E, les flavonoïdes, les coumarines et éventuellement la vitamine B₁₂ (320). En cas de stress oxydatif, le surplus de ROS favorise l'inflammation via des cytokines pro-inflammatoires (321), qui à leur tour peuvent favoriser la production de ROS (322).

Les ROS peuvent endommager les tissus en altérant les glucides, les protéines, les lipides et l'ADN (323). La peroxydation lipidique par les ROS est une conséquence relativement rapide du stress oxydatif. Les principaux produits en aval de la peroxydation lipidique sont mutagènes (324). Enfin, les ROS peuvent interagir

avec l'ADN et le modifier, entraînant un arrêt de la transcription, des erreurs de réplication ou une instabilité génomique (320). Dans certaines situations, la cellule a recours à l'autophagie – c'est-à-dire à la dégradation par la cellule de certains de ses constituants dans les lysosomes (325). Les dysfonctionnements de l'autophagie sont associés à la genèse de nombreuses situations pathologiques : athérosclérose, maladies dégénératives, insuffisance rénale, cancer... (326-329). Par ailleurs un défaut de vitamine B₁₂ est un facteur de risque de développement avec l'apparition de maladies telles que la schizophrénie, le diabète de type 2, la maladie d'Alzheimer ou la maladie de Parkinson (330-333), pour lesquelles le stress oxydant est considéré comme un élément physiopathologique important (320, 321).

4.1.2.2 Vitamines B₁₂ et stress oxydant

Un déficit en vitamine B₁₂ induit des modifications sur les macromolécules telles que les acides nucléiques, les protéines et les lipides, même chez des individus sans symptômes cliniques (334). Une méta-analyse récente a démontré une association entre carence en vitamine B₁₂ et augmentation des marqueurs associés à une altération de la stabilité de la myéline et des neurones périphériques, du fonctionnement mitochondrial et une augmentation du stress oxydant (335).

L'effet anti-oxydant d'une supplémentation en cyanocobalamine a été démontré dans des cellules endothéliales aortiques humaines, par observation d'une diminution des taux d'ions superoxydes dans le cytosol et les mitochondries (336). Des expériences dans des cellules neuronales ont corroboré ces résultats (337). La vitamine B₁₂ a également une action via le cycle du glutathion, par une cascade de réactions encore mal élucidée (338). La B₁₂ joue un rôle dans la modulation immunitaire, chez des patients ayant la maladie d'Alzheimer. Il a été trouvé un niveau d'interleukine-6 significativement plus élevé chez les patients ayant un statut B₁₂ bas par rapport à ceux ayant un statut normal en B₁₂ (339). Des études sur modèle animal ont également montré une augmentation du facteur de nécrose tumorale alpha (TNF α) (340). Ces résultats suggèrent que la vitamine B₁₂ pourrait protéger contre le stress oxydatif induit par l'inflammation (de bas grade) en modulant l'expression de cytokines et de facteurs de croissance, possiblement via la voie Nf- κ B (340).

Nous avons également vu précédemment que les folates et la vitamine B₁₂ sont des éléments nécessaires au métabolisme de l'homocystéine. Le déficit en vitamine B₁₂ réduit la conversion de l'Hcy en méthionine, responsable d'une

hyperhomocystéinémie, elle-même responsable d'une augmentation de la production de ROS (341, 342).

Enfin, en cas de stress oxydant, il est observé une altération de l'absorption de la cobalamine par la cellule. Cela crée un cycle de rétroaction dans lequel une carence en B₁₂ provoque un stress oxydatif, qui lui-même altère l'absorption cellulaire de vitamine B₁₂ (343) (**Figure 31**).

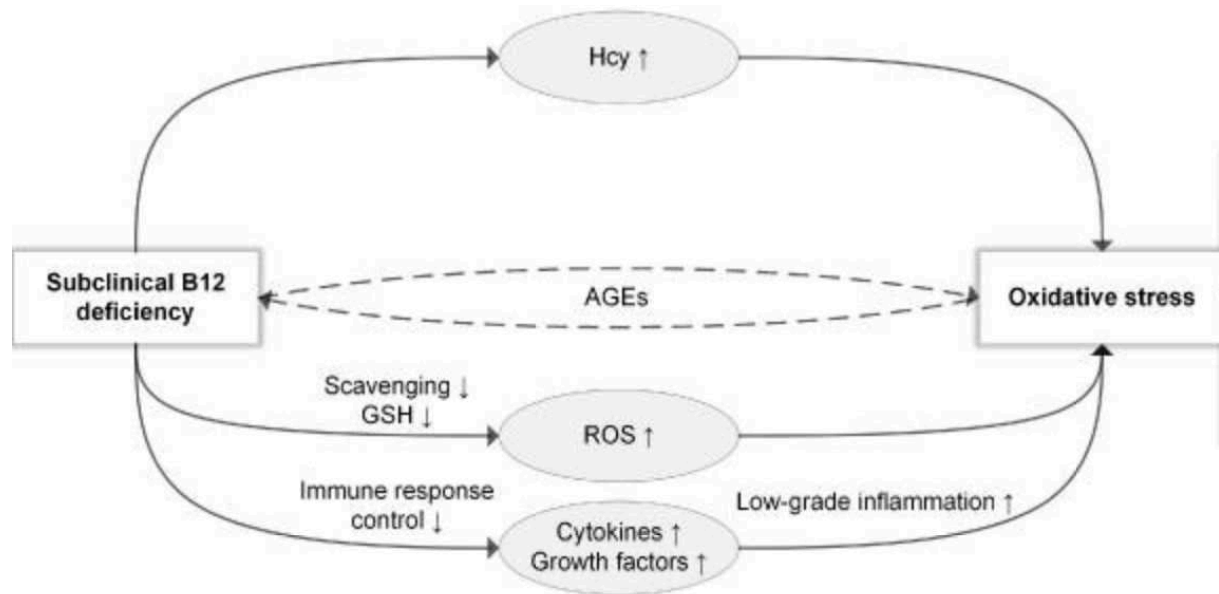


Figure 31. Relation entre déficit en vitamine B₁₂ et stress oxydant (d'après van de Lagemaat and al. Nutrient 2019). Une diminution de la vitamine B₁₂ est responsable d'un stress oxydatif par augmentation de l'homocystéine, augmentation de la production de ROS et par l'existence d'un état inflammatoire.

4.1.2.3 Le stress oxydant dans les erreurs innées du métabolisme de la vitamine B₁₂

Il est donc logique d'observer dans les erreurs innées du métabolisme de la vitamine B₁₂ une augmentation du stress oxydant, ou de ses conséquences. Il est observé dans ces pathologies une augmentation de l'expression de la protéine MnSOD, de la forme phosphorylée de p38 (forme active) et de JNK stress-kinase, le tout aboutissant à une apoptose des fibroblastes de patients (344-346). De façon attendue, il est observé une altération de la voie du glutathion (347). Dans des modèles de déficit en MUT, il est observé une augmentation importante de la production de ROS et donc un stress oxydant (348). Dans des modèles de déficit en vitamine B₁₂, il est prouvé qu'il existe

un stress oxydant et stress du réticulum endoplasmique déclenchée par une dysfonction de SIRT1 (35).

Dans le cas d'une altération isolée de la méthylmalonyl-CoA mutase (mutations des gènes *MMUT*, *MMAA*, *MMAB* ou *MMADHC*), il existe une accumulation de méthylmalonyl-CoA (349, 350). Cette accumulation et les produits qui en découlent (acide propionique ou acide 2-méthylcitrique), sont responsables d'une altération de la respiration mitochondriale et du métabolisme de l'ammoniac (350). Le tout est responsable d'une cataplérose du cycle de Krebs (349), par fuite des intermédiaires métaboliques du cycle. Il est également observé des anomalies structurelles (morphologie des mitochondries) et fonctionnelles du réseau mitochondrial responsable d'un dysfonctionnement principalement au niveau d'organes consommateur d'énergie : le cerveau et les reins. Il en résulte une diminution de la production d'énergie et une production accrue de ROS dans des cellules rénales (351) et des fibroblastes de patients MMA (352, 353).

Des dommages irréparables peuvent conduire à l'élimination des mitochondries endommagées par un processus d'autophagie sélectif appelé mitophagie. Un défaut de fonctionnement de ce processus, par altération de la voie PINK1 / Parkin, serait responsable de l'accumulation de mitochondries non fonctionnelles, et à l'origine de plusieurs manifestations cliniques (36, 354). Le concept de mitophagie et de stress cellulaire incontrôlé consécutifs à l'accumulation de MMA sont conformes aux observations d'un stress oxydant avec hyperproduction de lipocaline-2 circulante (LCN2) (351, 352).

4.1.3 Stress du réticulum endoplasmique causé par une diminution de synthèse de SIRT1

4.1.3.1 Stress du réticulum endoplasmique et *Unfolded Protein Response*

Le réticulum endoplasmique (RE) est un organite présent dans les cellules eucaryotes. Il correspond à un vaste réseau en continuité avec la membrane externe du noyau de la cellule (355). Le RE est responsable de la synthèse d'environ un tiers des protéines au sein des cellules eucaryotes, de leur modification post-traductionnelle, de leur assemblage en complexe, et de leur acheminement soit dans la cellule, soit dans l'espace extracellulaire. Initialement dépliées, les protéines vont progressivement acquérir leur conformation tri-dimensionnelle au sein de la lumière du RE, grâce à l'aide de protéines chaperonnes. Le repliement des protéines est un processus complexe, très sujet aux erreurs. Ainsi, le maintien d'un protéome sain dépend de mécanismes de contrôle de la qualité, dont certains opèrent au niveau du RE (356). L'homéostasie du RE est constamment mise au défi pour répondre aux besoins physiologiques et aux agressions pathologiques, impactant ses différentes fonctions dans la cellule : réservoir de Ca^{2+} , usine de repliement et d'assemblage des protéines, site de biosynthèse des lipides et des stérols ainsi que plate-forme de signalisation. Une synthèse accrue de protéines ou une perturbation de leur repliement peuvent entraîner une accumulation de protéines dépliées ou mal repliées dans la lumière du RE. Cette situation est appelée « stress du RE » (355).

Pour tenter de répondre à ces situations d'agression, les cellules eucaryotes ont mis en place plusieurs voies de signalisation permettant de moduler la transcription des gènes, la traduction de l'ARNm et les modifications des protéines, afin de tenter de restaurer l'homéostasie protéique. On parle d'UPR pour *Unfolded Protein Response* (**Figure 32**). L'UPR permet la mise en place de mécanismes adaptatifs pour maintenir une synthèse protéique optimale. Son activation a un impact sur presque tous ses aspects : synthèse, translocation et repliement des protéines, voire mise en place du processus d'élimination des protéines mal repliées par autophagie (355).

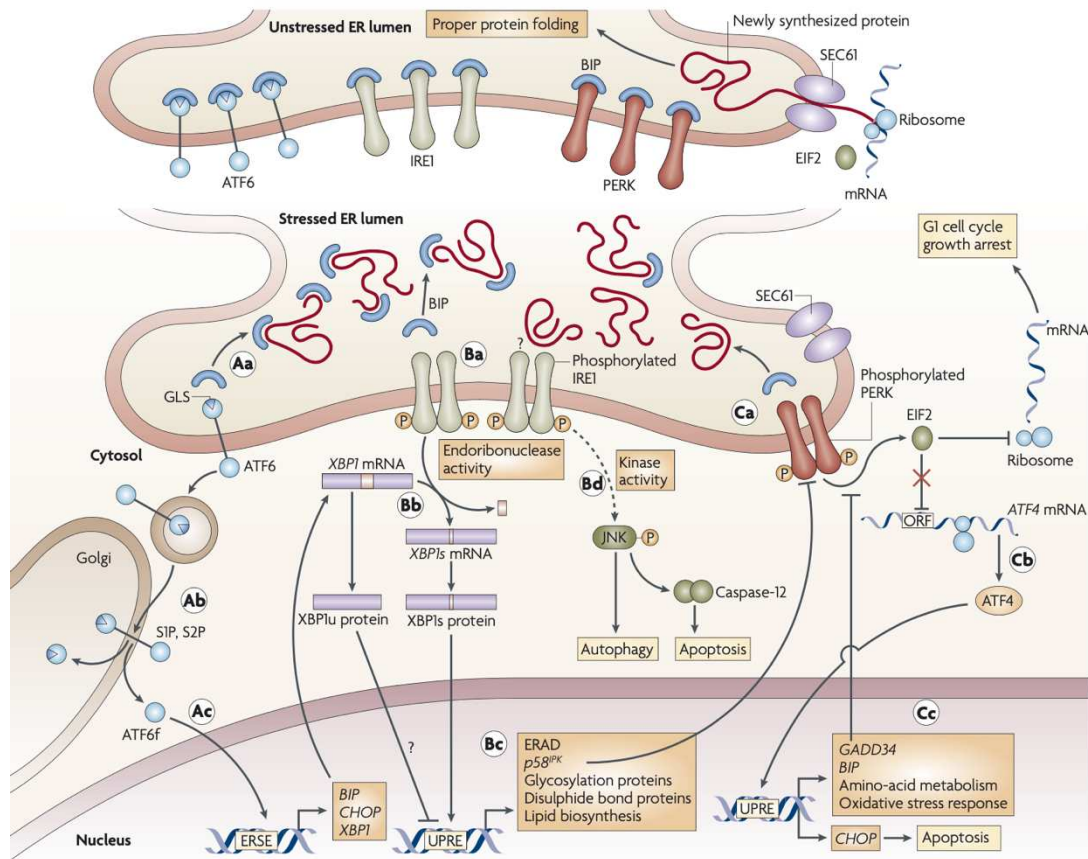


Figure 32. UPR, les voies de réponse cellulaire au stress du RE (d'après Todd and al. Nature Reviews Immunology 2008). Il existe trois voies de signalisation : PERK, IRE, ATF6/ PERK est une kinase transmembranaire dont l'extrémité N-terminale est localisée dans la lumière du RE. Sous l'effet du stress, on observe une dimérisation de PERK et son autophosphorylation, permettant son activation. PERK-P va ainsi pouvoir inactiver eIF2 α par phosphorylation, inhibant la transcription de la majorité des ARNm et ainsi d'une part importante de la synthèse protéique. D'autres protéines comme ATF4, un facteur de transcription, ne sont pas concernées par ce mécanisme. IRE-1 est dimérisée en cas de stress, ceci permet d'induire l'activité kinase. P-IRE-1 va permettre l'excision de 26 nucléotides sur l'ARNm codant pour XBP1. Par ce mécanisme proche d'une réaction d'épissage, un décalage du cadre de lecture est créé, aboutissant à la synthèse d'une protéine plus longue XBP1s. XBP1s va se délocaliser dans le noyau pour y reconnaître des séquences ADN appelées ERSE = "Endoplasmic Reticulum Stress response Element", correspondant à des séquences promotrices des gènes permettant la synthèse de molécules chaperonnes. L'activité endoribonucléase existe quand IRE-1 est activée et permet à l'instar de la voie PERK de limiter l'entrée de protéines dans le RE en dégradant les ARNm. ATF6 est un facteur de transcription transmembranaire. En cas de stress, ATF6 va migrer vers l'appareil de Golgi pour être hydrolysée par les protéases S1P et S2P, entraînant une dimérisation de l'extrémité N-terminale d'ATF6 portant l'activité de transcription. Dans le noyau, ATF6 reconnaît les séquences de type ERSE. BiP appartient à la famille des protéines de choc thermique de type HSP70. Il s'agit d'un modulateur majeur du réseau de l'UPR en se fixant aux 3 détecteurs (PERK, IRE-1 et ATF6) et en inhibant leur activation. Elle a également des propriétés anti-apoptotiques qui sont un atout capital pour la réussite du processus de l'UPR.

4.1.3.2 Diminution de la synthèse de Sirtuin 1 responsable d'une hyperacétylation d'HSF1

Chez les mammifères, Sirtuin1 (SIRT1, « Silent mating type Information Regulator Two homolog 1 ») est une protéine de la famille des Sirtuines (357). Elle est codée par le gène *SIRT1*. SIRT1 catalyse la désacétylation de la lysine des histones et d'autres protéines d'une manière NAD⁺ dépendante. (358, 359). SIRT1 joue un rôle important dans la longévité de plusieurs animaux inférieurs comme les vers et les mouches (360). Elle est localisée dans le cytosol ou le noyau, entre lesquels elle fait la navette en réponse à différents stimuli environnementaux, physiologiques ou pathologiques, tel que le stress cellulaire et la dérégulation du métabolisme énergétique (213).

SIRT1 régule le métabolisme énergétique cellulaire par la désacétylation de facteurs de transcription et de cofacteurs du métabolisme énergétique (360, 361). Outre son rôle dans le transfert métabolique d'électrons, le NAD⁺ interfère avec le métabolisme énergétique, la sécrétion d'insuline et l'adaptation cellulaire au stress (213, 362).

Dans la cellule, le déficit en vitamine B₁₂ conduit à un stress du RE par diminution de l'expression de SIRT1 (**Figure 33**) (213, 316). Le stress du RE est mis en évidence par une activation de la voie EIF2- α et par l'activation du facteur de transcription ATF6. Normalement, cette voie de signalisation est associée à une augmentation de l'expression des protéines de choc thermique (HSP – Heat Shock Proteins), qui est un processus d'adaptation extrêmement rapide au stress (363). Dans le cas d'un déficit en vitamine B₁₂, la diminution d'expression de SIRT1 est responsable d'une diminution de la transcription des HSP via une augmentation de l'acétylation de HSF1 (Heat Shock Factor 1). Cette altération peut être corrigée par un activateur pharmacologique de SIRT1, le SRT1720, corrigeant le stress du RE dans des cellules neuronales NIE115 (316). Le stress du RE est également augmenté dans les fibroblastes des patients *cb1C*, *cb1G* et *cb1G** présentant des troubles héréditaires du métabolisme cellulaire de la vitamine B₁₂ (317).

Par cette altération de la balance acétylation/désacétylation d'HSF1, la capacité de réponse de la cellule au stress du RE est altérée. Ceci est notamment observé par une diminution de la synthèse de HSP70 et HSP27 dans les cellules TO et les fibroblastes de patients (**Figure 33**) (316, 364). Cet effet de SIRT1 est démontré par la correction du stress du RE en cas d'ajout d'un activateur de SIRT1. L'ajout de vitamine B₁₂ et de SAM corrige les effets du stress et l'activation de l'apoptose, par

augmentation de l'expression des chaperons protéiques dans des cellules OT soumises à la thapsigargine, un puissant stimulateur de stress du RE. Ces données montrent que la vitamine B₁₂ et la SAM ont une forte influence sur le stress du RE (35).

L'effet pathologique d'une altération d'expression de SIRT1 va également se manifester par l'hyperacétylation de PGC-1 α (défaut de désacétylation) et par une anomalie de localisation des RBP.

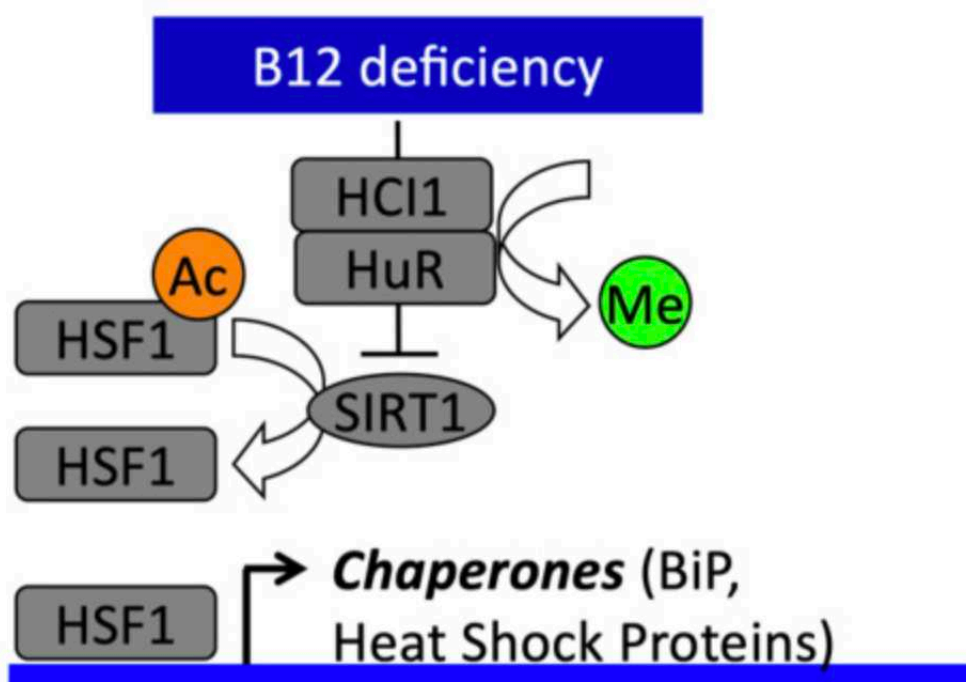


Figure 33. Influence de la vitamine B₁₂ sur le stress du RE (d'après Kosgei and al. Cells 2020). Le déficit en vitamine B₁₂ est responsable d'une activation du stress du RE et d'une diminution de l'expression des protéines chaperonnes HSP70 et HSP27 par hyperacétylation de HSF1.

4.1.4 Altération de la voie PGC-1 α par une diminution d'expression de SIRT1

Dans des modèles animaux de rats carencés en donneurs de méthyle durant la grossesse et la période de lactation, il est observé une altération du métabolisme des acides gras, une diminution d'activité des complexes I et II, une hypertrophie cardiaque et une stéatose hépatique chez les ratons (365). Ces altérations sont la conséquence d'une hyperacétylation et d'une hypométhylation de PGC-1 α et d'une dissociation du complexe PGC-1 α /PPAR α par diminution d'expression de SIRT1 et de la méthyltransférase PRMT1 (366) (**Figure 34**). Cette désactivation de PGC-1 α est associée au risque de développement de NASH chez les ratons issus de mères carencées, mais aussi de troubles neurologiques, par altération des mécanismes de neuroplasticité (213, 367, 368). Ces troubles de la plasticité sont la conséquence d'une diminution d'expression des synapsines (voie ER- α). La désactivation de PGC-1 α va également intervenir sur l'os, par une voie métabolique incluant le récepteur à la vitamine D (369), aboutissant à une moins bonne qualité de synthèse osseuse.

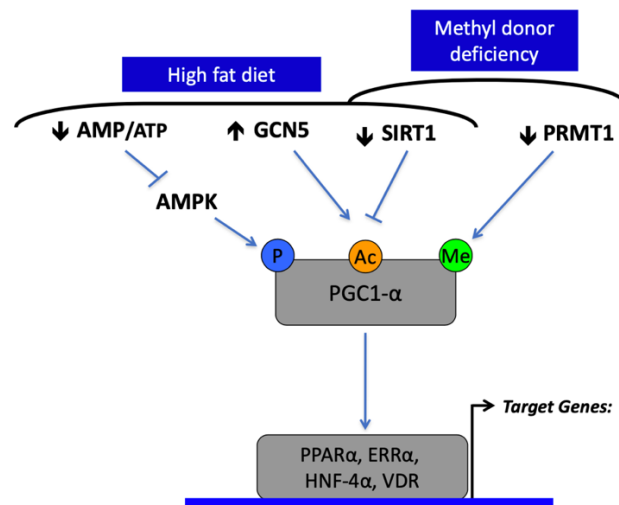


Figure 34. Une diminution d'expression de SIRT1 par déficit en donneur de méthyle ou en cas de régime riche en gras est responsable d'une inactivation de PGC1 α par hyperacétylation (d'après Kosgei and al. Cells 2020). SIRT1 régule PGC1 α avec d'autres voies signalétiques que sont PRMT1, AMPK et GCN5 qui peuvent également être perturbé dans le cas d'un déficit en cobalamine. PGC1 α est alors inactivé est responsable d'une diminution d'activation des récepteurs nucléaires que sont PPAR α , ERR α , HNF-4 α ou VDR.

4.1.5 Anomalie de localisation des RNA Binding Protein due à un déficit en cobalamine

4.1.5.1 Généralités sur les RNA Binding Protein (RBP)

Dans une cellule eucaryote, la première étape de l'expression génique est la transcription de l'ADN en ARNm. Cet ARNm va devoir sortir du noyau pour permettre la réalisation de la 2^e étape de l'expression génique : la traduction de l'ARNm en protéine. Les RBP sont essentiels à la régulation post-transcriptionnelle des gènes. En effet ils vont avoir une action sur la localisation, la stabilité et la traduction de l'ARNm cible (370). Elles ont un rôle important dans la différenciation tissulaire et le maintien de l'homéostasie. Chaque RBP peut agir sur des centaines voire des milliers d'ARNm cibles différents. Les RBP dérégulées peuvent donc entraîner divers états pathologiques (371). Elles ont notamment un rôle dans les mécanismes de tumorigénèse (370). Comme expliqué précédemment, la diminution d'expression de SIRT1 est étroitement liée avec une anomalie de localisation des RBP (35).

4.1.5.2 Human antigen R (HuR)

L'un des RBP les plus connus est l'antigène humain R (HuR), codé par le gène *ELAVL1* (372). HuR est le seul membre de la famille ELAVL à être exprimé de manière ubiquitaire dans tous les tissus humains - les autres (HuB (*ELAVL2*), HuC (*ELAVL3*) et HuD (*ELAVL4*)) sont principalement exprimés dans les cellules neuronales (373). Par son expression ubiquitaire, HuR est fondamental pour le bon fonctionnement cellulaire, et un dysfonctionnement d'HuR est associé à différents états pathologiques, y compris le cancer (374).

L'activité de HuR est régulée par une localisation subcellulaire dynamique (373, 375). Dans des conditions cellulaires physiologiques normales, HuR est principalement situé dans le noyau. Lors d'une exposition à un stress intrinsèque et/ou extrinsèque, HuR peut être transloqué dans le cytoplasme où il se stabilise et augmente la traduction des ARNm cibles (**Figure 35**) (374).

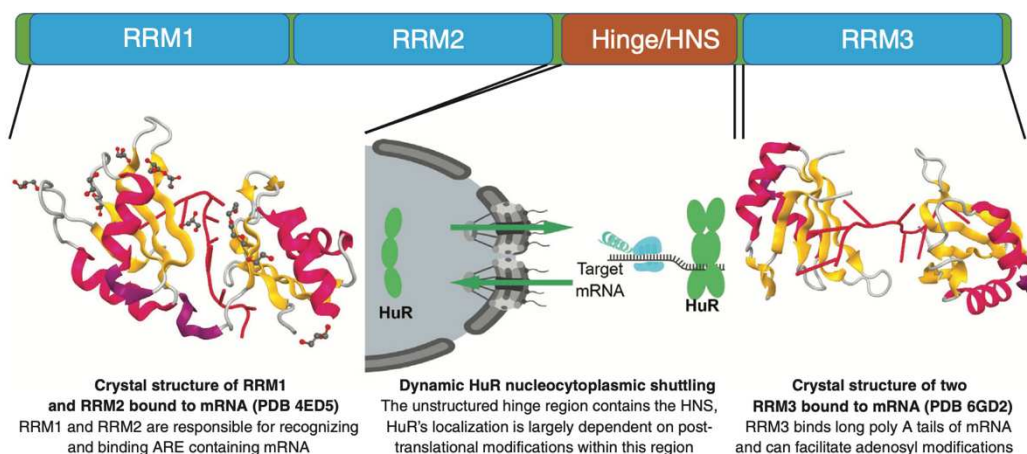


Figure 35. Structure et fonction de HuR (d'après Schultz and al. Wiley Interdiscip Rev RNA. 2020).

4.1.5.3 Effets d'un déficit en vitamine B₁₂ sur les RBP, dont HuR

Une altération de la localisation des RBP a été mise en évidence dans des modèles cellulaires N1E-115 (neuroblastome de souris), des fibroblastes de patients ayant une IEM-B₁₂, et un modèle animal CD320 KO (souris) (210). De nombreuses autres RBP sont impactées par les dysfonctions du métabolisme de la vitamine B₁₂, telles que HuR, hnRNPA1, Y14 ou SRSF1, par anomalie de méthylation et de phosphorylation. Dans les cellules ayant une carence en vitamine B₁₂, HuR reste en position nucléaire en situation de stress cellulaire (stress du RE et stress oxydant) alors qu'en temps normal, HuR permet une réponse de la cellule à l'agression en s'exportant dans le cytoplasme.

Ce défaut d'exportation vers le cytosol est la conséquence d'un défaut de méthylation (défaut de SAM et de la protéine méthyltransférase CARM1) ainsi que d'une hypophosphorylation de HuR par augmentation de l'activité de PP2A (91). Ces modifications sont responsables d'une diminution de l'affinité d'HuR pour le récepteur nucléaire CRM1/exportin (**Figure 36**).

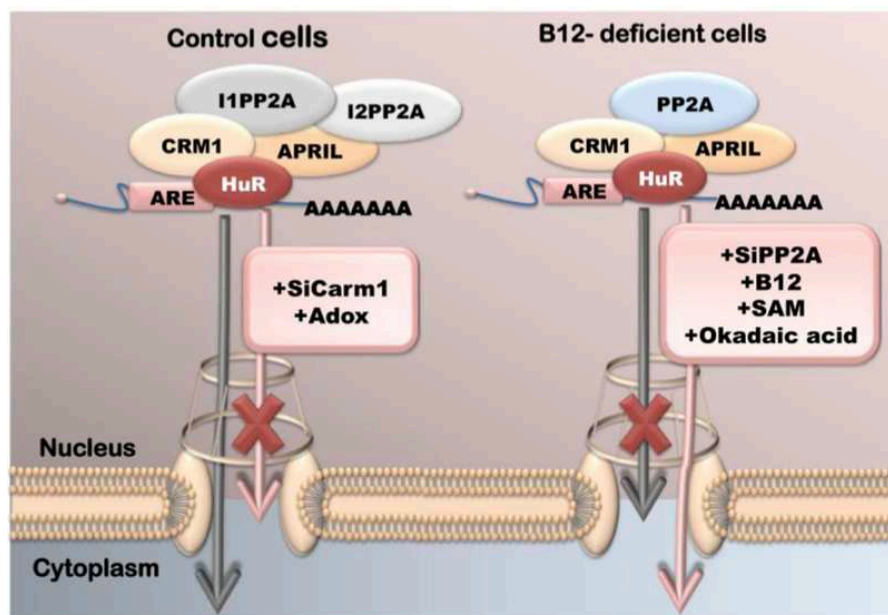


Figure 36. Effet d'un déficit en cobalamine sur l'exportation nucléaire de HuR (d'après Battaglia-Hsu and al. *Nucleic Acids Research* 2018). Dans les cellules ayant un déficit en vitamine B₁₂, l'interaction PP2A-ELAVL1/HuR empêche les interactions de ELAVL1/HuR avec les protéines habituelles, dont I1PP2A/ANP32A, I2PP2A/SET, APRIL and CRM1, responsable d'un blocage d'exportation depuis le noyau.

4.1.5.4 L'altération d'HuR entraîne la diminution de synthèse de la sirtuine SIRT1

La rétention de HuR au niveau nucléaire est responsable de la séquestration de différents ARNm, comme celui de SIRT1. Une diminution d'expression de SIRT1 est responsable d'une non-adaptation de la réponse cellulaire au stress du RE, comme rapporté précédemment (**Figure 37**), mais également de la diminution d'expression de nombreuses protéines impliquées dans le développement cérébral, la neuroplasticité, la formation de la myéline et le vieillissement dans le modèle cellulaire de carence en vitamine B₁₂ (210).

Des anomalies similaires sont observées dans les fibroblastes de patients (317), générant de nombreuses aberrations de l'épissage alternatif (376), un mécanisme également décrit pour d'autres pathologies tel que l'autisme ou la sclérose latérale amyotrophique (377, 378). L'analyse de l'expression des gènes dans les fibroblastes de patients affecte principalement les gènes impliqués dans le développement, les pathologies neurologiques, ophtalmologiques et cardiovasculaires, l'organisation du cytosquelette et la réaction cellulaire au stress. L'analyse protéomique confirme l'atteinte de ces différents processus (376).

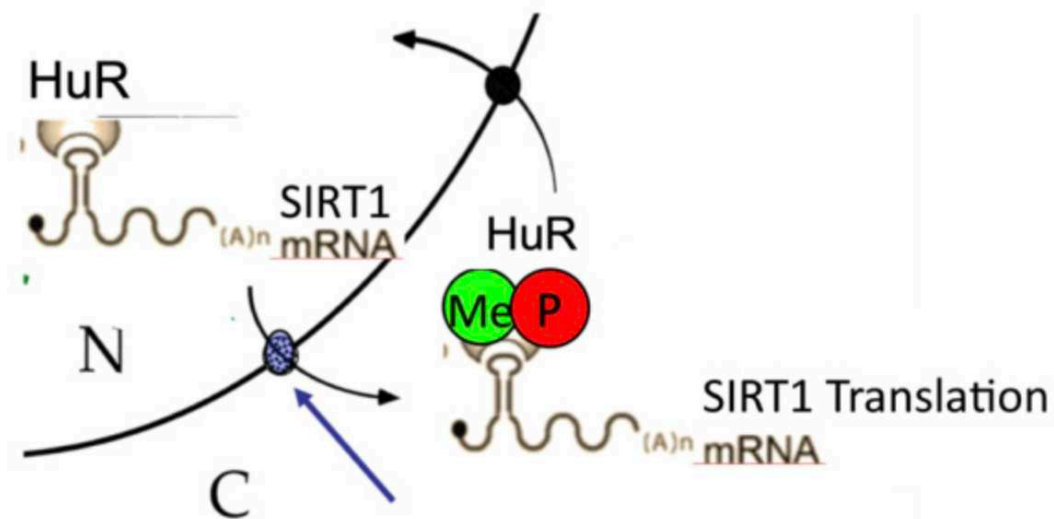


Figure 37. Altération du transfert du mRNA de SIRT1 par hypométhylation et hypophosphorylation de HuR (d'après Kosgei and al. Cells 2020). La carence en vitamine B₁₂ est responsable d'une localisation aberrante de HuR, une RBP impliquée dans la réponse au stress du RE. HuR est hypométhylé par défaut de SAM et déphosphorylé par augmentation de l'activité PP2A. Il en résulte une diminution d'expression du gène *SIRT1*, par défaut de transfert du noyau vers le cytosol.

4.1.6 Conséquences moléculaires, cellulaires et tissulaires

La synthèse intra-mitochondriale d'AdoCbl est un élément essentiel et fondamental dans le processus anaplérotique du cycle de Krebs. Une atteinte exclusive de cette voie contribue à la mortalité et à la fréquence de décompensations métaboliques observées.

L'atteinte de la voie de la reméthylation est associée à des anomalies du développement neurologique ou des troubles hématologiques. L'atteinte phénotypique s'explique par de nombreuses altérations allant de la régulation de l'expression des gènes à l'altération de l'expression protéique, un état de stress du RE par déséquilibre de l'état de phosphorylation/acétylation/méthylation de plusieurs protéines dont SIRT1 et PGC-1 α . Ces interactions sont résumées dans la **Figure 38**, et les mécanismes cellulaires à leur origine ont été brièvement expliqués précédemment.

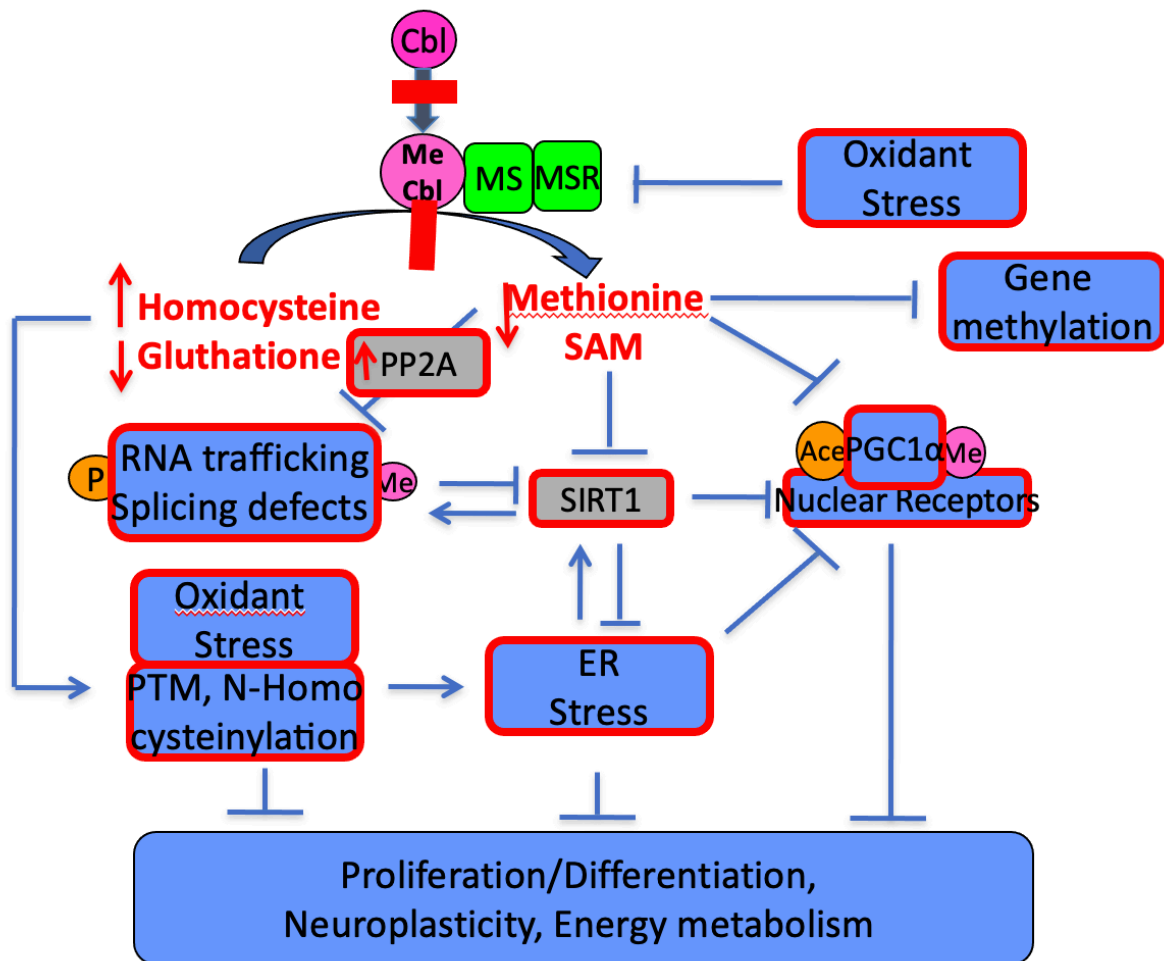


Figure 38. Conséquences physiopathologiques d'un déficit de méthionine synthase dans les erreurs innées du métabolisme de la vitamine B₁₂ (d'après Guéant and al. Critical reviews in biochemistry and molecular biology 2022).

Le déficit en vitamine B₁₂ et l'hyperhomocystéinémie sont responsables d'un stress oxydant, qui couplé à une diminution de la synthèse de SAM sont la cause d'un stress du RE, d'une diminution d'expression de SIRT1 et d'un déséquilibre phosphorylation/acétylation/méthylation des RBP et de PGC-1 α . Au total il est observé une altération de la prolifération et de la différenciation cellulaire, de la neuroplasticité et du métabolisme énergétique.

4.1.6.1 Effets sur les gènes : méthylation de l'ADN

Nous avons déjà expliqué le principe de méthylation, qui correspond au transfert d'un groupement méthyle (379). La S-adénosyl-méthyltransférase (MAT) catalyse le transfert du groupement adénosyle d'une molécule d'ATP vers une molécule de méthionine pour former une molécule de SAM. La SAM est principalement synthétisée dans le foie. Il existe trois isoformes de MAT (193). Le transfert du groupement méthyle est nécessaire pour permettre la méthylation de l'ADN au niveau d'un îlot CpG. Cette réaction génère une molécule de S-adénosyl-homocystéine (SAH) ayant un effet d'inhibiteur allostérique sur différentes méthyltransférases (380). La ratio SAM/SAH est un indicateur de la capacité de méthylation de la cellule (35).

N'importe quelle altération sur le métabolisme des monocarbones, qu'elle soit d'origine nutritionnelle, métabolique ou génétique est responsable de modifications épigénétiques et donc d'une modification de l'expression génique. La SAH est rapidement dégradée en homocystéine et adénosine permettant de réguler le ratio SAM/SAH au sein de la cellule. Néanmoins en cas d'hyperhomocystéinémie par exemple, la SAH s'accumule, déséquilibrant la balance SAM/SAH (381). L'hyperhomocystéinémie est associée à une perturbation des mécanismes de contrôle du processus de méthylation de l'ADN et des histones (382).

Il existe peu de données dans la littérature sur les modifications épigénétiques qui résultent d'un déficit en vitamine B₁₂. Il faut néanmoins souligner l'existence d'un modèle de souris sur-exprimant la protéine 5-LO (5-lipoxygénase), enzyme du métabolisme de l'acide arachidonique, qui en cas de déficit en vitamine B₁₂ et en folate présente une diminution très importante de l'expression cérébrale des enzymes DNMT1, DNMT3A et DNMT3B permettant la méthylation de novo de l'ADN (383). Dans un autre modèle (souris Mtrr), il est observé un retard de croissance intra-utérin et des malformations congénitales (384). Les modifications de marques épigénétiques sur l'ADN sont limitées au niveau hépatique et utérin : il n'en est pas noté au niveau cérébral. De plus les modifications significatives touchent un nombre limité de processus cellulaires (222). L'ensemble de ces données sont en faveur d'un impact limité d'un déficit en cobalamine sur les modifications épigénétiques au niveau de l'ADN.

4.1.6.2 Effets sur la synthèse protéique

Il existe peu de données dans la littérature sur l'effet d'un déficit de la vitamine B₁₂ sur la synthèse protéique dans son ensemble. Néanmoins, dans des cellules de patients *cb/C*, il a été observé une diminution significative de la synthèse de protéines associées à des pathologies neurologiques, musculaires et cardiovasculaires. Une supplémentation en hydroxocobalamine n'a pas permis de corriger cet effet par rapport au groupe contrôle (385). Dans des lymphocytes de patients *cb/C* il a été observé une altération de la synthèse protéique dans les voies du glutathion, du métabolisme énergétique, de l'organisation du cytosquelette et le transport intracellulaire (386). Ce n'est que très récemment qu'une analyse protéomique sur des fibroblastes a été réalisé, permettant d'observer des modifications de synthèse protéique en lien avec le fonctionnement mitochondrial, mais aussi des pathologies neurologiques, hépatiques et métaboliques (376).

Il est intéressant de noter une certaine homogénéité dans les processus impactés, soulignant l'atteinte ubiquitaire d'un défaut de la vitamine B₁₂ sur la synthèse protéique.

4.1.6.3 Effet sur les modifications post-traductionnelles (PTM)

4.1.6.3.1 Homocystéinylation des protéines

L'accumulation d'homocystéine est responsable de 2 effets biochimiques : la première, réversible, est la S-homocystéinylation des résidus cystéines ; la deuxième, est la N-homocystéinylation des résidus lysines par l'homocystéine-thiolactone, produite par la méthionine tRNA synthétase (MARS) (387, 388). La N-homocystéinylation n'est pas effectuée par une réaction enzymatique, mais est due à la formation d'une liaison amine entre une homocystéine-thiolactone et un groupement lysine. Les protéines ayant de nombreux résidus lysines sont plus susceptibles d'être sujet à cette PTM. On peut évoquer les lipoprotéines, l'albumine, l'hémoglobine, le cytochrome C ou la ferritine (389). La formation d'homocystéine-thiolactone est observée en cas de niveau élevée d'homocystéine au niveau intracellulaire. La N-homocystéinylation a des effets importants sur les protéines, en modifiant leur conformation tri-dimensionnelle et en modifiant leur activité (390). Elle est donc responsable d'une activation de la réponse UPR et d'une augmentation du stress du RE (391). L'effet de la N-homocystéinylation a été évalué dans des déficits dus à des variants sur *MTHFR* ou *CBS*, mais très peu dans le cas d'anomalie du métabolisme de la vitamine B₁₂ (389).

L'effet de la N-homocystéinylation a été évalué dans un modèle animal de rat, dont les mères étaient carencées en vitamine B₁₂ pendant la grossesse et pendant la lactation. Il a été observé une augmentation de l'homocystéinylation des protéines Tau, MAP1 et MAP4, ainsi que leur accumulation durant la vie de l'individu. Ce procédé était observé malgré un régime normal et une concentration plasmatique d'homocystéine normale. Elle est due à une augmentation d'expression de MARS au niveau cérébral (214). Elle est responsable d'une dégradation des fonctions cognitives et pourrait avoir un effet sur la plasticité synaptique. Les rats après 400 jours de vie avaient également un remodelage aortique avec une fibrose étendue et une anomalie sur l'élastine (392).

4.1.6.3.2 *Hypermalonylation/méthylmalonylation des protéines*

Dans un modèle animal de souris *Mmut*^{-/-} il a été observé des PTM à type de propionylation et de malonyl/méthylmalonylation par rapport aux témoins hétérozygotes de la même portée. Il n'était en revanche observé ni modification significative de la succinylation, ni de l'acétylation (44). Les extraits hépatiques de patients atteints de MMA présentaient la même hypermalonylation/méthylmalonylation et propionylation par rapport aux témoins, indiquant que ces PTM sont spécifiques à l'accumulation de MMA (393).

Dans les souris, il est rapporté un grand nombre d'enzymes avec un profil d'hypermalonylation/méthylmalonylation, notamment sur le cycle de l'urée, de la synthèse d'arginine, la décarboxylation de la glycine, ainsi que des réaction d'oxydo-réduction (393). Cette modification post-transcriptionnelle permettrait d'expliquer l'hyperglycinémie observée dans les aciduries organiques, par hyperméthylmalonylation de la GCSH, enzyme centrale du système de clivage de la glycine.

Cette modification post-transcriptionnelle est à mettre en lien avec un défaut d'expression de SIRT5, membre de la famille des sirtuines, principalement exprimée dans les mitochondries. Elle a par ailleurs une action régulatrice sur l'enzyme CPS1 (Carbamoyl phosphate synthetase I) (394).

4.1.6.4 Conséquences sur la prolifération cellulaire

Nous avons exposé différents mécanismes moléculaires qui sont la conséquence d'un déficit en vitamine B₁₂ : stress du RE, modifications épigénétiques, épissage alternatif, homocystéinylation, et autres. Ces différentes altérations sont étroitement associées à un déficit de disponibilité du MeTHF et donc à l'altération de la synthèse de bases puriques et pyrimidiques (395). Ces éléments sont nécessaires à la prolifération de tissus à haut index de prolifération (40), et donc en partie responsable des troubles observés : anémie et atrophie des muqueuses.

Le déficit en vitamine B₁₂ diminue la capacité de prolifération cellulaire et de différenciation dans différents modèles expérimentaux. Ainsi dans deux modèles expérimentaux de cancer, la privation de vitamine B₁₂ était associée à une diminution de la prolifération cellulaire (91, 93).

4.1.7 Effets d'une carence en vitamine B₁₂ sur le développement in utéro

4.1.7.1 Fetal programming

Le « fetal programming » est une hypothèse selon laquelle une grossesse incidentée par un trouble nutritionnel, endocrinien ou métabolique pourrait être responsable d'une adaptation prédisposant l'individu à naître à des pathologies cardiovasculaires, métaboliques et endocriniennes durant sa vie (396). Nous avons évoqué dans la première partie de ce travail, l'importance de la supplémentation en folates et les recommandations des sociétés savantes afin de limiter leurs conséquences sur le développement in utéro. En Amérique du Nord, l'enrichissement des céréales en folates a récemment soulevé le débat d'effets secondaires, notamment en cas de déficit en vitamine B₁₂ (397). Celui-ci ne fait que renforcer le rôle prépondérant de vitamine B₁₂ durant les premières étapes du développement (35).

L'étude « Pune Maternal Nutrition Study » a prouvé qu'une carence en cobalamine durant le premier trimestre de grossesse était associée à une plus grande prévalence d'obésité centrale ainsi qu'à une insulino-résistance chez les enfants de l'âge de 6 ans, d'autant plus important que le statut maternel en folate est élevé (398, 399). Par ailleurs, un taux de vitamine B₁₂ bas, un statut élevé en folate érythrocytaire ainsi qu'un niveau élevé de MMA était prédicteur de l'existence d'un syndrome métabolique et d'insulino-résistance (35). Le risque le plus élevé est observé en cas d'association d'un statut en folate très élevé associé à un statut en vitamine B₁₂ bas ou associé à un taux élevé de MMA (400).

Il a également été mis en évidence un lien entre déficit en vitamine B₁₂, obésité et diabète gestationnel (401). La combinaison d'un statut maternel carencé en vitamine B₁₂ et élevé en folate, associé à un régime alimentaire riche en glucide et pauvre en protéine chez les enfants, semble être en partie responsable de l'augmentation de la prévalence du diabète dans le sous-continent indien.

Ces études trouvent écho aux altérations sur les voies de SIRT1 ou PGC-1 α ainsi que la perturbation du métabolisme mitochondrial (35).

4.1.7.2 Anomalie de développement embryonnaire

L'anomalie de développement la plus connue dans les pathologies des monocarbones est l'anomalie de fermeture du tube neural. Il s'agit du résultat d'un processus complexe, à l'intersection de facteurs génétiques, nutritionnels et environnementaux (288). Le rôle de la vitamine B₁₂ dans l'embryogénèse du tube neural est probablement sous-estimé (402). Différents polymorphismes sur les gènes *MTR*, *MTRR* ou *TCN2* ont été incriminés dans la genèse d'anomalies de fermeture du tube neural (402-405). Plus récemment, l'analyse des concentrations en folates, en vitamine B₁₂, mais aussi des activités enzymatiques et des variants génétiques provenant de sang de cordon de fœtus avec une anomalie de fermeture du tube neural a permis de mettre en évidence la présence d'un déficit en vitamine B₁₂ ainsi qu'une diminution de l'activité, du transcrit et de l'expression de méthionine synthase chez les fœtus ayant une anomalie de fermeture du tube neural (406). Le taux de SAM était corrélé à l'activité de la MS, et plusieurs variants sur le gène *GIF* ont été identifiés. L'ensemble de ces données soulignent l'importance de la vitamine B₁₂ dans les processus d'embryogénèse du tube neural.

Il est également observé dans les anomalies du métabolisme de la vitamine B₁₂ un risque de cardiopathie congénitale. Le polymorphisme génétique des gènes *MTR* et *MTRR* a été associé à un risque de malformation cardiaque (407-409). Il a été rapporté des cas de dysplasie de la valve pulmonaire ou de la valve mitrale, de communication intra-ventriculaire, de communication inter-atriale, de non-compaction du ventricule droit (139), mais aussi de cardiomyopathies fœtales (410).

4.1.8 Apport des sciences omiques dans la compréhension physiopathologique.

Le XXe siècle a été riche en découvertes dans le domaine de la biologie. La découverte de la double hélice d'ADN par Watson et Crick en 1953 a ouvert l'aire de la génétique (411), rendu plus accessible par la mise au point de la Polymerase Chain Reaction (PCR) par Mullis en 1988 (412). Les sciences dites « omiques » sont constituées par plusieurs branches de la biologie moléculaire qui ont pour objectif la caractérisation et la quantification de pools de molécules pour comprendre la structure, la fonction et la dynamique d'un ou plusieurs organismes, à un instant donné, ceci ayant souvent pour objectif de décrire ou comprendre un phénotype et de comprendre les mécanismes physiopathologiques sous-jacents.

On distingue parmi d'autres branches : la génomique, la transcriptomique, la protéomique et la métabolomique (**Figure 39**). L'association de ces techniques en plus de permettre une meilleure compréhension de la physiopathologie, offre des biomarqueurs ou des perspectives thérapeutiques nouvelles.

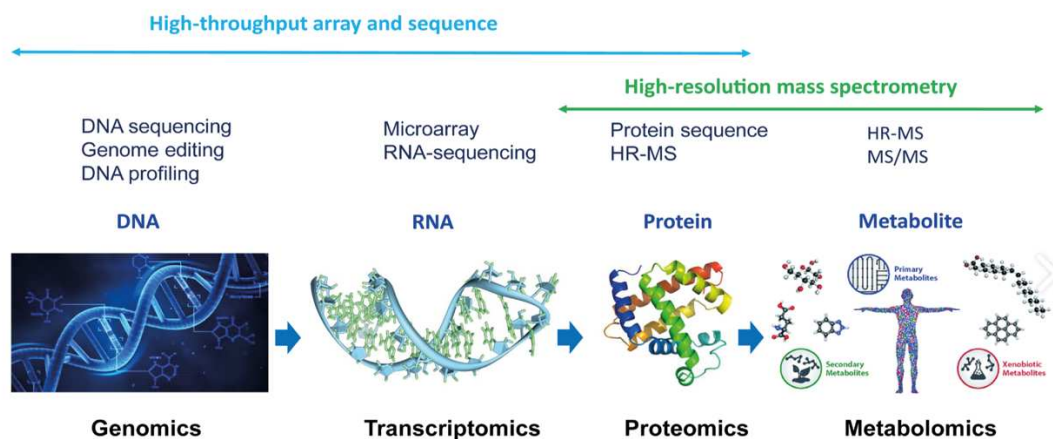


Figure 39. Application des méthodes à haut débit et à haute résolution dans le domaine des sciences omiques (d'après Khan and al. Journal of Applied Bioanalysis 2020).

4.1.8.1 Génomique

La génomique correspond à l'étude de l'ensemble du génome d'un organisme, c'est-à-dire l'ensemble des informations héréditaires nécessaires à son développement et à son fonctionnement (413). Le premier organisme pour lequel l'étude du génome a été réalisé est *Haemophilus influenzae*, dans les années 1990 (414). Le projet de réaliser la cartographie de l'ensemble du génome humain date de 1984, grâce à l'avènement des techniques à haut débit que nous avons détaillé dans la III^e partie de ce travail. Le premier chromosome humain entièrement séquencé, en 1999, est le chromosome 22, choisi pour sa petite taille et son rôle dans de nombreuses maladies. Le premier séquençage du génome humain a pris 12 ans et coûté près de 3 milliards de dollars (415). L'effort a impliqué des centaines de chercheurs à travers le monde et a été un tour de force de la technologie de séquençage Sanger de « première génération ». Cette technique de séquençage est totalement inadaptée à la tâche de séquencer le génome de millions de patients rapidement et à moindre coût (251). L'intégralité du génome de *Homo neanderthalensis* a été rendu public en 2013 (416). La génomique, première des sciences omiques, a été à la base du développement de thérapies innovantes et notamment de thérapie génique (417).

4.1.8.2 Transcriptomique

La transcriptomique regroupe l'ensemble des éléments transcrits dans la cellule, à savoir les ARNm, les ARNnc et les petits ARN. Elle permet d'identifier la quantité d'ARN issue de la transcription du génome, à des moments différents de la vie d'une cellule, ainsi que sa localisation au sein de la cellule.

Les premières analyses de transcriptomique ont été réalisées par une technique de balises de séquence exprimée (appelé EST, Expressed Sequence Tag), ainsi que par la technique SAGE (Serial Analysis of Gene Expression). Ces techniques fastidieuses passaient par l'isolation de la séquence d'ARN recherchée, puis la production du brin d'ADN complémentaire (418, 419). La transcriptomique a connu un bon en avant avec l'arrivée des techniques contemporaines appelées « microarray » (420), basées sur les mêmes techniques que précédemment, mais dont la principale limite était de ne pouvoir rechercher que des séquences connues. Ces puces permettent une analyse à haut débit, donnant une information quantitative et qualitative utile, notamment utilisée en pratique courante pour la recherche d'ARN viral dans les fluides biologiques (421).

La dernière étape dans l'analyse du transcriptome est l'avènement du RNA Seq, permettant le séquençage de l'ensemble de l'ARN d'une cellule de manière aléatoire (422). Certains protocoles permettent l'analyse uniquement de l'ARNm, ou d'étudier les ARNnc présents dans la cellule, enfin d'autres permettent d'isoler les ARN nucléaires (423). Cette technique de haut débit est extrêmement informative sur la production d'ARN par une cellule ou un tissu à un instant donné.

4.1.8.3 Protéomique

La protéomique est l'étude de l'ensemble des protéines d'une cellule, d'un organe, d'un tissu, d'un organe ou d'un organisme à un moment donné et dans des conditions données (424). Elle permet d'informer sur plusieurs pans de l'expression protéique : la protéomique structurale, qui s'intéresse à la structure primaire, secondaire et tertiaire des protéines et la protéomique fonctionnelle qui étudie l'expression des protéines au niveau cellulaire, les modifications des protéines et leurs interactions permettant une meilleure compréhension des maladies (425). Différentes techniques permettent à présent une analyse exhaustive des protéines : l'analyse par rayons X, la spectrométrie par RMN ou la spectrométrie de masse, la chromatographie Liquide Haute Performance ou l'électrophorèse bidimensionnelle SDS-PAGE (Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium) (426). Elles ont permis de générer un grand nombre de données dont l'analyse informatique par biostatistique est complexe.

4.1.8.4 Métabolomique

Le métabolome est l'étude de l'ensemble des métabolites dans un liquide biologique ou un tissu à un instant donné. Il comprend l'étude des petites molécules produites par le métabolisme intermédiaire ou les hormones (427). Le métabolome est un ensemble complexe et dynamique, les métabolites étant perpétuellement synthétisés, dégradés ou utilisés. L'approche peut être ciblée ou non, si l'on va analyser un certain nombre de métabolites en regard d'une problématique donnée (428). Une attention particulière est nécessaire pour l'extraction et le stockage des échantillons pour ne pas dégrader les métabolites d'intérêt. Les métabolites sont un élément intéressant et important, permettant de se rapprocher du phénotype présenté par un patient, et de mieux comprendre les mécanismes de la maladie (429, 430).

4.2 Objectifs de l'étude n°3

Les mécanismes à l'origine de la grande variabilité des manifestations cliniques dans les erreurs innées du métabolisme de la vitamine B₁₂ sont partiellement élucidés. Il a été montré dans des modèles cellulaires et animaux l'existence d'un stress oxydant et un stress du réticulum endoplasmique. La diminution d'activité de la MS est par ailleurs associée à une diminution d'expression de SIRT1, par altération du transport nucléocytoplasmique des RNA binding protein comme HuR. Le défaut de localisation des RNA binding protein est également responsable d'une altération d'expression des gènes impliqués dans le métabolisme énergétique, la neuroplasticité et le développement cérébral (43). L'altération de la synthèse de SAM et des activités sirtuines ont un effet sur le fonctionnement mitochondrial via l'inactivation de récepteurs nucléaires (PPAR- α , ER- α , ERR- α , et HNF-4 α) ou de co-activateurs (PGC-1 α). Dans les acidémies méthylmaloniques isolées, l'accumulation d'acides organiques tel que l'acide méthylmalonique est associé à des modifications de la structure mitochondriale, mais aussi du fonctionnement énergétique par cataplérose du cycle de Krebs. Il est aussi noté des PTM sur des protéines impliquées dans des voies métaboliques cruciales (349, 350, 431).

Par une analyse multi-omique, nous évaluerons l'effet d'un déficit génétique du métabolisme de la vitamine B₁₂ de type *cb/C* sur des enzymes clés d'autres voies métaboliques. Ainsi, une altération fonctionnelle d'autres voies métaboliques pourrait participer à l'explication de la grande variabilité clinique présentée par les patients ayant un déficit de la vitamine B₁₂, telle que rapportée par notre méta-analyse (II^e partie de mon travail de thèse).

4.3 Introduction de l'étude n°3

Chez l'homme, la vitamine B₁₂ (cobalamine, Cbl) est le cofacteur de deux enzymes, la méthionine synthase (MS, codée par le gène *MTR*) et la méthylmalonyl-CoA mutase (MUT, codée par le gène *MMUT*) (395). La MS a besoin de méthylcobalamine (MeCbl) et de méthyltétrahydrofolate (MeTHF) pour la reméthylation de l'homocystéine en méthionine. La MS réductase (MSR, codée par *MTRR*) maintient l'activité de la MS par la réactivation de la cobalamine lorsque celle-ci s'oxyde (43). La MUT nécessite comme cofacteur l'adénosylcobalamine (AdoCbl) pour catalyser la conversion de la L-méthylmalonyl-CoA en succinyl-CoA. Les erreurs innées du métabolisme de la Cbl (IECM) résultent d'un déficit d'une enzyme nécessaire au transport ou à la transformation de la Cbl en ces deux formes actives. Elles sont généralement classées en groupes *cb/A-J*.

Les IECM responsables d'une diminution sélective de l'activité de la MS (Hcy-IECM) entraînent une augmentation de l'Hcy et une diminution de la synthèse de la méthionine et de SAM. La SAM est le donneur universel de groupement méthyle, requis pour les réactions de méthylation de l'ADN, des histones et d'autres petites molécules (43). Le groupe Hcy-IECM comprend les groupes de complémentation *cb/G* et *cb/E*, avec des mutations respectivement sur les gènes *MTR* et *MTRR*. Les IECM avec une diminution isolée de l'activité MUT (MMA-IECM) conduisent à l'accumulation de L-méthylmalonyl-CoA et d'acide méthylmalonique (MMA), ainsi qu'à une diminution de la synthèse du succinyl-CoA, qui est un métabolite du cycle de l'acide tricarboxylique (TCA). La réaction catalysée par la MUT est l'étape finale de la reconstitution anaplérotique du cycle de Krebs par le catabolisme de certains acides aminés, des acides gras à chaîne carboné impaire et de la chaîne latérale du cholestérol (44). Ces déficits sont secondaires à des mutations sur le gène *MMUT*, le gène *MMAB* (*cb/B*), qui est nécessaire à la synthèse de l'AdoCbl, le gène *MMAA* (*cb/A*), qui est responsable de l'interaction de l'AdoCbl avec la MUT, ainsi que les gènes codants pour la méthylmalonyl-CoA épimérase (*MCEE*) ou la succinate-CoA ligase (*SUCLG1*, *SUCLA2*). Les IECM avec un déficit combiné des activités MS et MUT (IECM combiné, abrégés C-IECM) comprennent les troubles du transport intracellulaire de la Cbl qui altèrent la synthèse de MeCbl et d'AdoCbl et donc les voies de reméthylation et mitochondriale. Ces troubles intracellulaires concernent les protéines lysosomales, LMBD1 (*cb/F*) et ABCD4 (*cb/J*), et deux protéines

cytoplasmiques, MMACHC (*cb1C*) et MMADHC (*cb1D*). Les C-IECM associent les conséquences métaboliques des altérations des activités de la MS et de la MUT.

Les Hcy-IECM sont très rares. Ces patients présentent une anémie mégaloblastique, des difficultés d'alimentation, des vomissements, et des manifestations neurologiques, (léthargie, retard mental et convulsions) dès la première année de vie (133, 317). Les autres signes neurologiques et l'atrophie cérébrale surviennent plus tard dans l'histoire naturelle de ces maladies. La plupart des patients atteints de MMA-IECM présentent des manifestations cliniques précoces, notamment une acidose métabolique par décompensation du métabolisme énergétique, un retard de croissance et de développement, une hypotonie, une épilepsie et une altération de la fonction rénale. Le décès et les décompensations métaboliques aiguës sont fréquemment signalés au cours de la première année de vie, mais peuvent également survenir plus tardivement. Ils sont liés à un œdème cérébral, notamment secondaire à l'hyperammoniémie (432). En revanche, les C-IECM peuvent présenter différents sous-ensembles de tableaux cliniques selon l'âge du patient. La fréquence des manifestations cliniques est principalement rapportée dans le type *cb1C*, qui est la C-IECM la plus fréquente. Les premières manifestations comprennent l'anémie mégaloblastique, le retard psychomoteur, l'hydrocéphalie, les troubles de la conscience, les cardiomyopathies, l'hypertension pulmonaire, la rétinopathie, le syndrome hémolytique et urémique atypique et la stéatose hépatique. L'ataxie, la neuropathie périphérique et les manifestations thromboemboliques apparaissent plus tardivement au cours de la vie. Des décompensations sévères et parfois mortelles ont été rapportées au cours de la première année de vie. Les manifestations ophtalmologiques sont principalement rapportées dans le cas de *cb1C* (rétinopathie précoce) et de *MMUT* (atrophie optique débutant au cours de la deuxième décennie). Elles sont plus sporadiques dans les autres IECM (317, 432, 433).

Les mécanismes génomiques secondaires à l'altération de la fonction MS ont été examinés en profondeur par notre groupe ainsi que d'autres groupes au cours des dernières années. Cependant, la relation entre ces mécanismes génomiques et la grande variabilité des présentations cliniques n'a pas encore été explorée. Nous avons montré dans des cellules de patients et des modèles animaux que l'altération de l'activité de la MS est associée au développement d'un stress du RE en lien avec une diminution de l'expression de la protéine cytosolique SIRT1 ainsi que de la protéine SIRT3 mitochondriale (43). L'altération de la synthèse de SAM et des activités des

sirtuines impactent le métabolisme énergétique mitochondrial via l'inactivation de récepteurs nucléaires (PPAR- α , ER- α , ERR- α et HNF-4 α) de leur coactivateur PGC-1 α (43, 317). Les anomalies de méthylation et de phosphorylation des protéines de liaison à l'ARN sont associées une altération de l'épissage et de la circulation nucléocytoplasmique des ARNm. Ces mécanismes ont un effet sur l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme énergétique, la neuroplasticité et le développement des fonctions cérébrales et optiques (43, 210, 376).

Les altérations génomiques observées dans les cellules et les modèles animaux des C-IECM et Hcy-IECM nous ont conduit à émettre l'hypothèse que la variabilité clinique observée est liée à des mécanismes génomiques spécifiques, translationnels et post-traductionnels secondaires à une altération de l'activité MS. Pour répondre à cette question, nous avons réalisé un phénotypage métabolique, génomique et protéomique, y compris des modifications post-traductionnelles, dans des fibroblastes de patients *cb1C*, *epi-cb1C* et *cb1G*. Nous avons comparé ces phénotypes à ceux de fibroblastes témoins. Nous avons analysé les effets sur les gènes et les enzymes liés à d'autres pathologies métaboliques héréditaires. Nous avons cherché à savoir si ces pathologies sont responsables de présentations cliniques et métaboliques similaires à celles rapportées dans le cas d'IECM dans une base de données in silico de 824 patients dont le diagnostic est génétiquement prouvé (434).

4.4 Matériels et méthodes

4.4.1 Patients, fibroblastes de patient et culture cellulaire.

Nous avons recueilli les données cliniques et biologiques de patients suivis par le Centre de référence des maladies métaboliques héréditaires du CHRU de Nancy (3 *cb1C*, 1 *epi-cb1C*). Leurs résultats cliniques et métaboliques ont été comparés à ceux de 3 patients suivis pour un déficit de type MMA-IECM recrutés dans notre Centre. Ils ont également été comparés aux données classiquement rapportées dans le déficit de type *cb1G* ainsi que dans le cas d'autres IEM (déficit du cycle de l'urée, déficit en β -oxydation des acides gras et hyperglycémie sans cétose).

Nous avons réalisé le phénotypage omique sur 3 lignées de fibroblastes (2 cas *cb1C* et le cas *epi-cb1C* qui avait été pris en charge dans notre centre) et l'avons comparé à celui des fibroblastes de 3 cas *cb1G* et d'un témoin. Les fibroblastes de patients ont été obtenus par biopsie cutanée au cours de leur suivi.

Les cellules utilisées étaient entre leurs 10^e et 15^e passages. Elles ont été testées négative pour une infection par mycoplasme. Les cellules ont été maintenues en culture dans du DMEM Gu 4500 /L(A D5796) complété par du sérum de veau foetal à 10% (Eurobio, CVFSVF0001), 1% de pyruvate de sodium (Sigma Aldrich, S8636), 1% de pénicilline-streptomycine (Sigma Aldrich, P4333). Elles ont été incubées à 37°C avec 5% de CO₂ jusqu'à confluence. Le milieu de culture a été changé tous les trois jours. Les cellulesensemencées sont confluentes après 4-5 jours, avec une densité de 6 000 cellules par cm².

Les fibroblastes ont été reprogrammés en iPSC par induction des gènes Oct3/4, Sox2, Klf4 et c-Myc (OSKM) via le vecteur du virus Sendai (SeVV), à l'aide du kit de reprogrammation Sendai CytoTune-iPSC 2.0 (Invitrogen-ThermoFisher Scientific, Les Ulis, France). Les cellules induites ont été cultivées sur une matrice de vitronectine dans le milieu complet Essential 8 (Gibco, ThermoFisher Scientific). La différenciation en cardiomyocytes a été réalisée à l'aide d'un kit de différenciation (Gibco, ThermoFisher Scientific, Les Ulis, France).

4.4.2 Analyses du métabolome

Les cellules homogénéisées ont été remis en suspension mécaniquement dans du PBS à l'aide d'une aiguille à seringue, suivi d'une ultrasonication à 4°C et d'une centrifugation à 12 000g pendant 20 minutes. Le surnageant a été recueilli pour l'analyse LC-MSMS. Brièvement, les surnageants ont été mélangés avec du DTT puis précipités en ajoutant du méthanol froid et maintenus sur la glace pendant 30 minutes. Après décantation, la phase liquide a été diluée avec quatre volumes d'acide formique à 0,1%. Les expériences ont été réalisées à l'aide du Shimadzu LCMS 8045 ESI (Kyoto, Japon) et analysées à l'aide du logiciel Insight v3.1 (Shimadzu, Kyoto, Japon).

Pour l'analyse du métabolisme énergétique mitochondrial, les cellules ont étéensemencées pendant une nuit dans des miniplaques à 8 puits de type XFp Cell Culture (Seahorse Biosciences) à une densité de 12 500 cellules par puits. Une heure avant la mesure, le milieu de culture a été remplacé par le milieu de base XF sans rouge de phénol et complété par 1 M de glucose, 100 mM de pyruvate de sodium et 200 mM de L-glutamine. Les taux de consommation d'oxygène (OCR) et d'acidification extracellulaire (ECAR) ont été mesurés selon le protocole du kit Seahorse XFp Cell Mito Stress Test Kit recommandé par Seahorse Biosciences. L'oligomycine, le FCCP et l'antimycine A/roténone ont été utilisés conformément au protocole du fabricant pour

mesurer la respiration mitochondriale basale, la respiration liée à l'ATP, la fuite de H⁺ (proton), la respiration maximale, la capacité respiratoire de réserve et la respiration non mitochondriale. Les données présentées sont normalisées par rapport à la quantité totale de protéines par puits. Les expériences ont été réalisées en double et répétées trois fois séparément.

4.4.3 Analyses transcriptomiques par RNA-Seq.

Les cellules ont été trypsinées puis l'ARN total a été isolé du culot cellulaire à l'aide du mini kit d'extraction RNAeasyTM (Qiagen) et traité par la DNase I (Ambion, AM1906). La qualité de l'ARN a été évaluée à l'aide du bioanalyseur 2100 (Agilent). Les bibliothèques RNA-Seq ont été construites à l'aide du kit complet ScriptSeq pour humain/souris/rat (Epicentre, Illumina). Tout d'abord, l'ARNr a été retiré de l'échantillon à l'aide du kit magnétique Ribo-Zero. Le kit de préparation de bibliothèques RNA-Seq ScriptSeq v2 a ensuite été utilisé pour fabriquer la bibliothèque RNA-Seq à partir de l'ARN traité par Ribo-Zero. Les bibliothèques RNA-Seq ont été quantifiées par picogreen et visualisées sur le bioanalyseur Agilent. Le séquençage du transcriptome a été réalisé sur trois réplicats biologiques de chaque lignée cellulaire à l'aide du séquenceur Illumina TruSeqTM. Les fragments d'ADN ont été lus sur des séquences nucléotidiques de 100 paires de bases. Les données brutes du séquençage sont compilées dans un format standard FASTQ et ont été utilisées pour l'analyse bioinformatique.

4.4.4 Analyses protéomiques.

Les analyses protéomiques ont été réalisées par nano-LC/MSMS couplé à un spectromètre de masse Orbitrap Fusion ETD. Elles ont été obtenues comme décrit dans la Supplementary Table de la référence (376).

Succinctement, les protéines totales ont été extraites du culot cellulaire à l'aide du tampon de lyse RIPA. La suspension de protéines a été placée dans un bain à ultrasons pendant 30 min, suivi de trois cycles de congélation-décongélation avec de l'azote liquide et d'un bain marie à 37°C. Les tubes ont ensuite été soumis à une centrifugation à 20 000g/30 min/4°C. Le surnageant protéique a été récupéré puis dosé avec le kit BCA Assay (Interchim) et précipité avec de l'acétone avant l'analyse par nano-LC-MS/MS (376).

4.4.5 Analyses bioinformatiques pour l'étude de transcriptomique.

Le contrôle de qualité des séquences nucléotidiques a été effectué à l'aide de FastQC v0.11.5 (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) et les lectures ont été associées au génome GRCh38 par HISAT2 v2.0.4 - (435). Les transcrits épissés différentiellement ont été assemblés à partir des alignements obtenus avec Stringtie v1.3.3b (436) pour identifier les nouvelles isoformes et les isoformes déjà connues du génome de référence GRCh38. Les données ont été ajustées de manière plus précise avec la méthode de normalisation des moyennes des valeurs M (TMM) (437), puis transformées en utilisant le logarithme base 2 (\log_2 -) et les comptes par million (cpm) afin d'estimer les expressions différentielles, comme décrit précédemment (438).

Le séquençage de l'ARN en paires des 24 échantillons a généré une moyenne de 110,2 millions de lectures par échantillon. Après avoir retiré les adaptateurs et les lectures de faible qualité, les lectures ont été alignées sur le génome de référence hg38. Le taux d'alignement global était de 90,55 % (écart-type +/- 1,86 %), avec une qualité moyenne de lecture mappée de 99,97 % (score PHRED 37,2) et une taille d'insertion moyenne de 362,5 pb (écart-type +/- 621,4). Environ 10,94 % (de 9,7 % à 11,4 %) des lectures ont été cartographiées dans des régions introniques.

Un total de 55204 transcrits a été reconstruit au cours de l'étape suivante, ce qui a conduit à un transcriptome de 50818 transcrits uniques et 16808 gènes uniques après filtrage par rapport aux trois échantillons de contrôle (une valeur moyenne de cpm > 0,5 a été considérée comme une preuve d'expression dans le groupe contrôle). La modélisation linéaire avec Bayes a ensuite été appliquée pour évaluer l'expression différentielle au niveau des gènes et des transcrits entre le groupe témoin et chaque lignée cellulaire de patient.

4.4.6 Analyse bioinformatique des données protéomiques pour déchiffrer les PTM.

Pour l'analyse des modifications post-traductionnelle, les fichiers bruts ont été analysés par le logiciel Peaks Online X (build 1.6, Bioinformatics Solution Inc) en utilisant la base de données Homo Sapiens (SwissProt release 2022_02, 20377 entrées). La tolérance de la masse de référence a été fixée à 10 ppm et celle des fragments à 0,5 Da. Le clivage tryptique spécifique a été sélectionné et un maximum de 2 clivages manqués a été autorisé.

La moitié d'un pont disulfure (C) a été définie comme modification fixe. Les modifications variables possibles sont l'oxydation (M), la désamidation (NQ) et les acylations (acétylation (K), benzoylation (K), butyrylation (K), crotonaldéhydation (K), crotonylation (K), glutarylation (K), malonylation (K), myristoylation (K), palmitoylation (K), propionaldéhyde (H, K), propionylation (K), succinylation (K)). Le nombre maximal de modifications variables par peptide était limité à 3. Les identifications ont été filtrées sur la base d'un seuil FDR (False Discovery Rate) de 1 % au niveau des groupes de peptides et de protéines. La correspondance entre les séries a été effectuée avec une tolérance d'erreur de masse de 20 ppm et avec la tolérance de décalage du temps de rétention de l'autodétection.

Les statistiques multivariées sur les mesures de protéines et les graphiques de résultats ont été générés à l'aide de Qlucore Omics Explorer 3.7 (Qlucore AB, Lund, SWEDEN). Une valeur seuil positive de 1 a été spécifiée pour permettre une transformation log2 des données d'abondance pour la normalisation, c'est-à-dire que toutes les valeurs de données d'abondance inférieures au seuil seront remplacées par 1 avant la transformation. Les données transformées ont finalement été utilisées pour l'analyse statistique, c'est-à-dire l'évaluation des peptides modifiés différenciellement présents entre deux groupes en utilisant un test t bilatéral de Student et en supposant une variance égale entre les groupes. Une valeur p supérieure à 0,05 a été utilisée pour filtrer les candidats différentiels.

L'analyse de l'ontologie génique pour les processus biologiques et les fonctions moléculaires (FDR<0,05) a été réalisé avec ShinyGO V0.76 (439).

4.5 Résultats.

4.5.1 Présentation clinique et métabolique des patients.

Trois patients atteints de *cb1C* ont été analysés. P1 a présenté une hypotonie axiale et un coma avec hyperammoniémie pendant la période néonatale. P2 a présenté des manifestations neurologiques et une atrophie cérébrale pendant la période préscolaire. P3 a eu une thrombose veineuse profonde à l'âge adulte liée à une augmentation importante de l'homocystéine en l'absence de tout autre facteur de risque. P3 ne présentait aucun autre symptôme. P4 est un patient diagnostiqué avec un déficit de type *epi-cb1C*. Il est décédé à un mois de vie en raison d'une insuffisance cardiaque et respiratoire secondaire à une hypertension pulmonaire. Les rapports de cas exhaustifs

et l'analyse des acides aminés plasmatiques avant traitement sont détaillés au point 4.5.1.1. et **Table 23**.

Les caractéristiques métaboliques des patients *cb/C* et *epi-cb/C* ont été comparées à celles de 3 cas de MMA-IECM recrutés dans notre centre et à la présentation métabolique classique d'autres IEM, à savoir les déficits du cycle de l'urée, les anomalies de la β -oxydation des acides gras, l'hyperglycinémie sans cétose et les pathologies mitochondriales (**Figure 40**).

Le phénotypage métabolique des trois *cb/C* et de l'épi-*cb/C* a montré des altérations métaboliques de type hyperglycinémie et hyperammoniémie qui pourraient refléter des altérations au niveau du cycle de Krebs et du cycle de l'urée, mais aussi de la décarboxylation de la glycine (**Figure 40**). Nous observons de faibles taux sanguins d'arginine chez deux patients *cb/C*. P1 avait un faible taux sanguin d'ornithine associé à un faible taux sanguin de citrulline et d'arginine, mais aussi une hyperammoniémie, une hyperlactacidémie et une augmentation du taux d'acyl-carnitine C16-C18. P2 avait également un faible taux sanguin d'ornithine, alors que la glutamine, la glycine et l'alanine étaient augmentées. P3 avait un faible taux de glycine et un taux sanguin de citrulline plus élevé. Le patient épi-*cb/C* avait un faible taux d'arginine, d'ornithine, de glutamine et d'alanine. Nous avons également observé des taux accrus de glycine et de citrulline.

Certains de ces cas présentaient des similitudes métaboliques avec d'autres pathologies responsables d'une hyperammoniémie et/ou d'une hyperglycinémie. Il s'agit notamment de déficit du cycle de l'urée, du déficit en glycine décarboxylase (GLDC) et de déficit de la chaîne respiratoire mitochondriale (**Figure 40**). Nous avons émis l'hypothèse que ces similitudes pourraient être liées à une altération de l'expression génétique et/ou de l'activité de gènes et d'enzymes apparentés.

4.5.1.1 Description détaillée des cas cliniques

Patient 1. La patiente 1 était une fille et le deuxième enfant d'un couple consanguin d'origine méditerranéenne. Elle est née au terme de 37 SA + 6. La grossesse a été marquée par la sensation de diminution des mouvements actifs fœtaux. Depuis sa naissance, elle a présenté des difficultés alimentaires et une hypotonie axiale, responsable d'une perte de poids de 12 %. Les analyses sanguines ont montré une acidose métabolique (pH 7,29, BE -10,5 mmol/L, lactate 3,9 mmol/L) avec cétonémie (0,4 mmol/L) sans augmentation de la protéine C-réactive. Elle présentait une

pancytopénie. Une maladie métabolique de type intoxication a été suspectée. Un traitement intraveineux par apports hypercaloriques glucido-lipidiques, carnitine, benzoate de sodium, acide carglumique et hydroxocobalamine a été initié. L'analyse des acides organiques urinaires a révélé la présence d'acide méthylmalonique et on a observé un taux sanguin élevé d'homocystéine. Sous traitement, l'évolution a été favorable. L'échographie cardiaque a décrit de multiples communications inter-ventriculaires apicales sans retentissement sur la fonction cardiaque. L'analyse moléculaire du gène *MMACHC* a révélé une mutation homozygote (c.271dupA).

Patient 2. La patiente 2 est une fille caucasienne de 4 ans, qui s'est présentée à l'hôpital pour des troubles de la conscience (score de Glasgow à 6). Elle était le premier enfant d'un couple non apparenté. Elle n'avait pas d'antécédents médicaux et son développement psychomoteur et social était décrit comme normal jusqu'à l'âge de 4 ans. À cet âge, elle a progressivement perdu la capacité de marcher, de parler et de réaliser des mouvements précis en quelques mois. Elle est restée stable sur le plan hémodynamique mais a présenté 3 épisodes d'arrêt respiratoire, dont un a nécessité un soutien ventilatoire par ventilation mécanique. L'IRM cérébrale a objectivé une atrophie cérébrale globale et des hypersignaux des ganglions de la base et du corps calleux. L'arrêt respiratoire pourrait résulter d'un dysfonctionnement neurologique central. L'échocardiographie était sans particularité. Les analyses biologiques ont mis en évidence une hyperhomocystéinémie (275 µmol/L) et une augmentation de l'acide méthylmalonique dans le sang (33,1 µmol/L). En raison de la suspicion d'une erreur innée de la cobalamine, elle a été initialement traitée par vitamine B₁₂, carnitine, bétaïne et méthionine. Elle a progressivement présenté une restauration neurologique partielle conduisant à une récupération fonctionnelle, notamment sur le plan du langage. L'analyse moléculaire du gène *MMACHC* a révélé une mutation hétérozygote composite (c.271dupA ; c.440G>C).

Patient 3. Un homme de 44 ans, de race blanche, traité pour hypertension artérielle, a présenté en 2020 une thrombose veineuse profonde péronière gauche à deux reprises, à la suite de longs voyages. Ses antécédents familiaux faisaient état d'une hypertension artérielle associée à un épisode de thrombose veineuse profonde chez sa mère. Son indice de masse corporelle était de 36 kg/m², il ne présentait pas de dyslipidémie. L'exploration de première ligne de la thrombose n'a pas trouvé d'anomalies significatives. L'analyse biochimique de deuxième ligne a révélé une hyperhomocystéinémie (95 µmol/L) et de l'acide méthylmalonique dans le sang et les

urines. L'analyse génétique du gène *MMACHC* a révélé une hétérozygotie composite (c.271dupA ; c.394C>T). La supplémentation en vitamine B₁₂ a été initiée par injection sous-cutanée en raison de la contre-indication de l'injection intramusculaire due au traitement anticoagulant. L'échocardiographie n'a pas révélé d'anomalies cardiaques ; l'examen ophtalmologique et physique étaient normaux. Les anomalies biochimiques ont été corrigées par le traitement. Il n'a pas eu de récurrence de thrombose.

Patient 4. La patiente était une fille de race blanche, née à terme (39 semaines d'aménorrhée). La grossesse s'est déroulée normalement, à l'exception d'un RCIU avec un poids de naissance de 2450g. Son premier mois de vie a été marqué par une intolérance alimentaire et des régurgitations traitées symptomatiquement. Elle s'est présentée aux urgences en raison de la présence de sang dans les régurgitations. L'examen clinique n'a noté qu'une hypotonie. Une anémie sévère (3,5 g/dL) arégénérative a été observée sur l'hémogramme sans atteinte des autres lignées. Le scanner cérébral et l'échographie abdominale étaient sans particularité. L'analyse de la moelle osseuse a conclu à une dysgranulopoïèse probablement due à une altération du métabolisme de la vitamine B₁₂. Le taux sanguin d'homocystéine était à 174 µmol/L et celui d'acide méthylmalonique à 325 µmol/L. L'évolution était défavorable avec une pancytopenie progressive et l'apparition d'une acidose métabolique (pH 7,08, BE -19). Elle a développé une insuffisance cardiaque et respiratoire due à une hypertension pulmonaire nécessitant une ventilation mécanique, une sédation profonde et de l'oxyde nitrique inhalé. Aucune autre anomalie n'a été constatée à l'échocardiographie. Dans les jours qui ont suivi, elle a présenté une défaillance de plusieurs organes qui a conduit à son décès à un mois de vie. L'analyse moléculaire du gène *MMACHC* a révélé une mutation hétérozygote composée du gène *MMACHC* (c.271dupA) et du gène *PRDX1* (c.515-1G>T).

Patient 5. Le patient est un homme d'origine caucasienne, né à terme (40 + 1 âge gestationnel) après une grossesse marquée par un diabète gestationnel et un accouchement par voie basse sans particularité. Il était le premier enfant d'un couple non-consanguin. A 3 jours de vie, il a été transféré dans notre centre pour suspicion de volvulus intestinal en raison de vomissements bilieux et d'une déshydratation sévère (perte de poids de 15%). Les analyses sanguines ont révélé une acidose métabolique (pH 7,33, BE -10,5), une protéine C-réactive normale et une cétonurie (++) . Une nutrition parentérale et une antibiothérapie IV ont été initiées. Une laparotomie exploratoire a été réalisée, qui s'est avérée non contributive. À 5 jours de

vie, il a présenté des myoclonies brachiales dans un contexte de coma et de détresse respiratoire avec une acidose métabolique (pH 7,25, BE -8,7, lactate 2,5 mmol/L) et une hyperammoniémie (543 $\mu\text{mol/L}$). Un traitement intraveineux avec des apports énergétiques glucido-lipidiques élevés, de la carnitine, du benzoate de sodium, de l'acide carglumique et de l'hydroxocobalamine a été initié. L'hémodiafiltration a été commencée 3 heures plus tard, permettant de normaliser l'ammoniaque en 12 heures (55 $\mu\text{mol/L}$). L'analyse des acides organiques urinaires a révélé la présence d'acide méthylmalonique. Malgré un bon contrôle métabolique ($\text{NH}_3 < 10 \mu\text{mol/L}$), il a présenté une insuffisance respiratoire aiguë à 8 jours de vie en raison d'une hypertension pulmonaire sévère, qui n'a pas été améliorée par protoxyde d'azote inhalé, sédation profonde et curarisation. Il est décédé après 15 jours de soins. L'analyse moléculaire du gène *MMUT* a révélé une mutation hétérozygote composite (c.949delA ; c.91C>T).

Patient 6. La patiente 6 était le deuxième enfant d'un couple consanguin d'origine méditerranéenne. Elle est née à terme (41 SA). La grossesse et l'accouchement étaient sans particularité. Elle a présenté un retard de croissance intra-utérin (poids de naissance de 2780 g). À deux jours de vie, elle présentait des difficultés alimentaires et une hypotonie. Elle présentait une acidose métabolique et une hyperammoniémie (1080 $\mu\text{mol/L}$). De l'acide méthylmalonique a été mesuré dans le sang et l'urine. Des apports glucido-lipidiques élevés (nécessitant une insulinothérapie transitoire), de la carnitine, du benzoate de sodium, de l'acide carglumique et de l'hydroxocobalamine ont été introduits. Elle a été transférée dans notre CHU pour mise en place d'une hémodiafiltration, pendant 3 jours. L'évolution a été favorable, avec une correction progressive de l'hyperammoniémie (64 $\mu\text{mol/L}$ à 6 jours de vie). L'électroencéphalogramme et l'échographie crânienne étaient sans particularité. Elle a présenté quelques épisodes de décompensations métaboliques aiguës avec hyperammoniémie durant sa première année de vie, dues à des maladies infectieuses intercurrentes. Toutes ont été traitées avec succès. Deux ans plus tard, l'évolution était satisfaisante avec une autonomie alimentaire et de déambulation. L'analyse moléculaire du gène *MMUT* a révélé une mutation homozygote (c.1106G>A).

Patient 7. Le patient était un garçon et le troisième enfant d'un couple méditerranéen consanguin d'origine méditerranéen. Il est né au terme de 41 SA + 6 avec un petit poids de naissance (3060g). La grossesse et l'accouchement étaient non incidentés. En raison d'antécédents familiaux d'alopécie et de retard d'ossification crânienne dans sa famille, une IRM cérébrale a été réalisée à 2 jours de vie, qui était normale. À 3

jours de vie, il a présenté une insuffisance respiratoire, une hypotonie, une hypothermie et une perte de poids importante (15 %), qui a nécessité une assistance ventilatoire. Il présentait une acidose métabolique (pH 7,21, bicarbonates 16 mEq/L) avec cétonurie (+++) ainsi qu'une hyperammoniémie (370 $\mu\text{mol/L}$). En raison de la suspicion d'acidurie organique, des apports glucido-lipidiques élevés, de la carnitine, du benzoate de sodium, de l'acide carginique et de l'hydroxocobalamine ont été introduits. Il a été transféré en réanimation pour une mise en place d'une épuration extra-rénale en raison de l'augmentation de l'ammoniémie (457 $\mu\text{mol/L}$). 36 heures après l'initiation, les paramètres métaboliques ont été corrigés. De l'acide méthylmalonique a été observé dans les urines. À 6 jours de vie, il a présenté un choc septique dû à une infection néonatale à streptocoque, qui a nécessité un soutien par noradrénaline. Le taux de lactate sanguin est resté élevé malgré la stabilité hémodynamique, et a été amélioré par une supplémentation en citrate, thiamine et biotine. L'échocardiographie a signalé l'existence d'un foramen ovale persistant. Il présentait une anémie et une thrombocytopenie, qui ont été corrigées par transfusion sanguine et correction des troubles métaboliques. L'électroencéphalogramme était normal pour l'âge. L'analyse moléculaire du gène *MMUT* a montré une mutation homozygote (c.1207C>T). L'évolution était favorable.

4.5.1.2 Chromatographie des acides aminés plasmatiques détaillée des patients

Table 23. Chromatographie des acides aminés des 7 patients au diagnostic.

		Normal value	cbIC			epicbIC	cbIG		
			P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7
Taurine	µmol/L	30-170	/	60	72	35	138	122	135
Acide Aspartique	µmol/L	0-31	/	2	4	4	20	3	16
Hydroxyproline	µmol/L	20-59	51	14	5	17	5	42	8
Thréonine	µmol/L	89-167	/	290	100	85	87	181	74
Sérine	µmol/L	107-163	245	240	83	88	143	145	98
Asparagine	µmol/L	38-121	/	46	31	45	15	124	42
Acide Glutamique	µmol/L	8-179	58	37	108	54	185	15	121
Glutamine	µmol/L	402-776	586	781	647	265	341	493	300
Proline	µmol/L	149-233	139	204	271	285	240	494	147
Glycine	µmol/L	189-291	291	425	174	599	697	720	273
Alanine	µmol/L	233-331	254	415	498	231	164	186	149
Citrulline	µmol/L	12-28	10	18	34	44	6	21	5
Alpha Aminobutyrique	µmol/L	6-24	16	42	25	65	19	43	11
Valine	µmol/L	145-249	79	154	236	319	275	428	85
1/2 Cystine	µmol/L	61-105	6	13	71	15	33	58	100
Méthionine	µmol/L	23-35	<5	3	20	5	18	56	23
Isoleucine	µmol/L	40-80	16	44	62	63	72	147	15
Leucine	µmol/L	79-151	48	77	119	186	209	275	41
Tyrosine	µmol/L	52-106	90	44	58	61	67	566	288
Phénylalanine	µmol/L	45-65	44	47	56	72	65	145	60
Homocysteine	µmol/L	Unobservable	183	50	95	28	0	0	0
Ornithine	µmol/L	55-121	48	54	55	48	74	95	58
Lysine	µmol/L	141-211	154	151	197	196	508	1263	363
Histidine	µmol/L	61-91	/	82	87	82	894	110	97
3 Methylhistidine	µmol/L	0-7	/	7	13	10	16	32	12
Arginine	µmol/L	49-77	37	46	9	14	26	55	19
Aminoacidémie total	µmol/L	2339-3403	/	3357	3172	2924	3525	5822	2548
Ammoniémie	µmol/L	64 - 102	176	22	NA	64	543	1080	457

	C -IECM					Hcy-IECM	MMA-IECM			Urea cycle disorders [†]						CPT2D	GLDCD [‡]	OATD	P5CS [¶]	MT ^{**}
	Meta-analysis*	P1-cblC	P2-cblC	P3-cblC	P4-Epi-cblC	Meta-analysis*	Meta-analysis*	P5	P6	P7	CPSI	NAGS	OTC	ASS	ASL					
Lactate																				
Ammonemia	28.6%					0%	88.9%													
Plasma amino acids																				
Glutamine																				
Alanine																				
Citrulline																				
Arginine																				
Arginosuccinate																				
Glycine																				
Lysine																				
Ornithine																				
Methylmalonic	95.8%					0%	100%													
Urine organic acids																				
Orotic acid																				
Methylmalonic	100%					0%	100%													
Acyl-carnitine																				
C0																				
C2																				
C3	100%					0%	100%													
C16-C18																				

in normal value
 Above normal value
 Under normal value
 Not performed/reported

Figure 40. Marqueurs biochimiques métaboliques dans les erreurs innées du métabolisme de la vitamine B₁₂* par rapport à 3 patients atteints d'un déficit de type cblC, 1 epi-cblC, 3 MMUT au moment du diagnostic comparés aux anomalies biologiques typiques observées dans d'autres erreurs innées du métabolisme. Notes. MMUT : methylmalonyl-CoA mutase, CblC : cobalamin C, Epi-CblC : PRDX1 gene-related epi-cblC disease, MMA : Methylmalonic acidemia, CPSI : Carbamoyl phosphate synthetase 1, NAGS : N-acetylglutamate synthetase, OTC : Ornithine transcarbamylase, ASS : arginosuccinate synthetase, ASL : arginosuccinate lyase, ARG : arginase, SCADD : Short-chain acyl-CoA dehydrogenase (SCAD) deficiency, MCADD : Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) deficiency, LCADD : Very long chain acyl CoA dehydrogenase deficiency, CPT2D : Carnitine palmitoyltransferase II deficiency, GLDCD : glycine decarboxylase deficiency, OATD : Ornithine-δ-aminotransferase deficiency, P5CSD : Delta-1-pyrroline-5-carboxylate-synthetase deficiency (ALDH18A1 mutation), MT : Mitochondrial respiratory chain disease, C0 : carnitine libre, C2 : acétylcarnitine, C3 : propionylcarnitine.

* Les marqueurs biochimiques IEM-B₁₂ sont extraits de la méta-analyse de Wiedemann et al. 2022 avec le pourcentage d'occurrence rapporté dans la littérature. 10% de résultats rapportés au-dessus ou en dessous des valeurs normales sont signalés comme des valeurs anormales observées (434).

† Les troubles des acides aminés plasmatiques signalés dans les anomalies du cycle de l'urée sont ceux rapportés par (440).

§ Aucun trouble des acides aminés plasmatiques n'est classiquement rapporté dans les anomalies de la bêta-oxydation des acides gras selon (441).

‡ Les acides aminés plasmatiques ne sont pas modifiés en cas d'hyperglycinémie sans cétose selon (442).

|| Les acides aminés plasmatiques sont modifiés en cas de déficit en OAT avec apparition d'une hyperammoniémie néonatale selon (443) et (440).

¶ Les acides aminés plasmatiques sont modifiés en cas d'ALDH18A1 selon (444).

** Les métabolites sanguins observés en cas de maladies de la chaîne respiratoire mitochondriale sont rapportés selon (445). Les acylcarnitines pourraient être augmentés sans spécificité selon (446).

4.5.2 Étude métabolomique.

Nous avons réalisé une analyse métabolomique des acides organiques, du cycle de Krebs et de la glycolyse dans des fibroblastes de patients ayant un déficit de type *cb/C* et épi-*cb/C*. Les résultats ont été comparé à des fibroblastes de patients ayant un déficit de type *cb/G* et à des fibroblastes témoins. Le patients épi-*cb/C* est celui décrit précédemment.

Nous avons observé une concentration de propionate très importante dans les fibroblastes *cb/C* et épi-*cb/C* par rapport aux fibroblastes témoins. Cette accumulation de propionate est une conséquence bien connue de l'altération de la conversion du méthylmalonyl-CoA en succinyl-CoA. Nous avons également observé une diminution de la concentration de citrate et de fumarate, indiquant un dysfonctionnement partiel du cycle de Krebs. Ces changements n'ont pas été observés dans les fibroblastes *cb/G*. En revanche, l' α -cétoglutarate était augmenté dans les fibroblastes *cb/G* par rapport aux cellules témoins (**Figure 41**).

Nous avons également observé une augmentation spectaculaire de la concentration de glyoxalate et de méthylglyoxal dans les fibroblastes *cb/C* et épi-*cb/C* par rapport aux cellules témoins (**Figure 42**).

Nous avons observé une diminution de la concentration de SAM et de SAH dans les fibroblastes des cas *cb/C* et *cb/G*, par rapport aux cellules témoins (**Figure 43**).

Ces différents résultats sont confirmés par des analyses dans les cellules souches pluripotentes induites (iPSC) et des iPSC différenciées en cardiomyocytes (iPSC-CM) obtenues à partir de fibroblastes de patients *cb/C* et *cb/G*. Nous notons une augmentation des concentrations d' α -cétoglutarate dans les cellules de patients comparées aux cellules témoins (**Figure 43A**). Cette altération au niveau de cycle de Krebs se répercute sur la respiration mitochondriale avec une diminution de la respiration basale et de la respiration maximale dans les fibroblastes de patients comparés aux cellules témoins (**Figure 43B**).

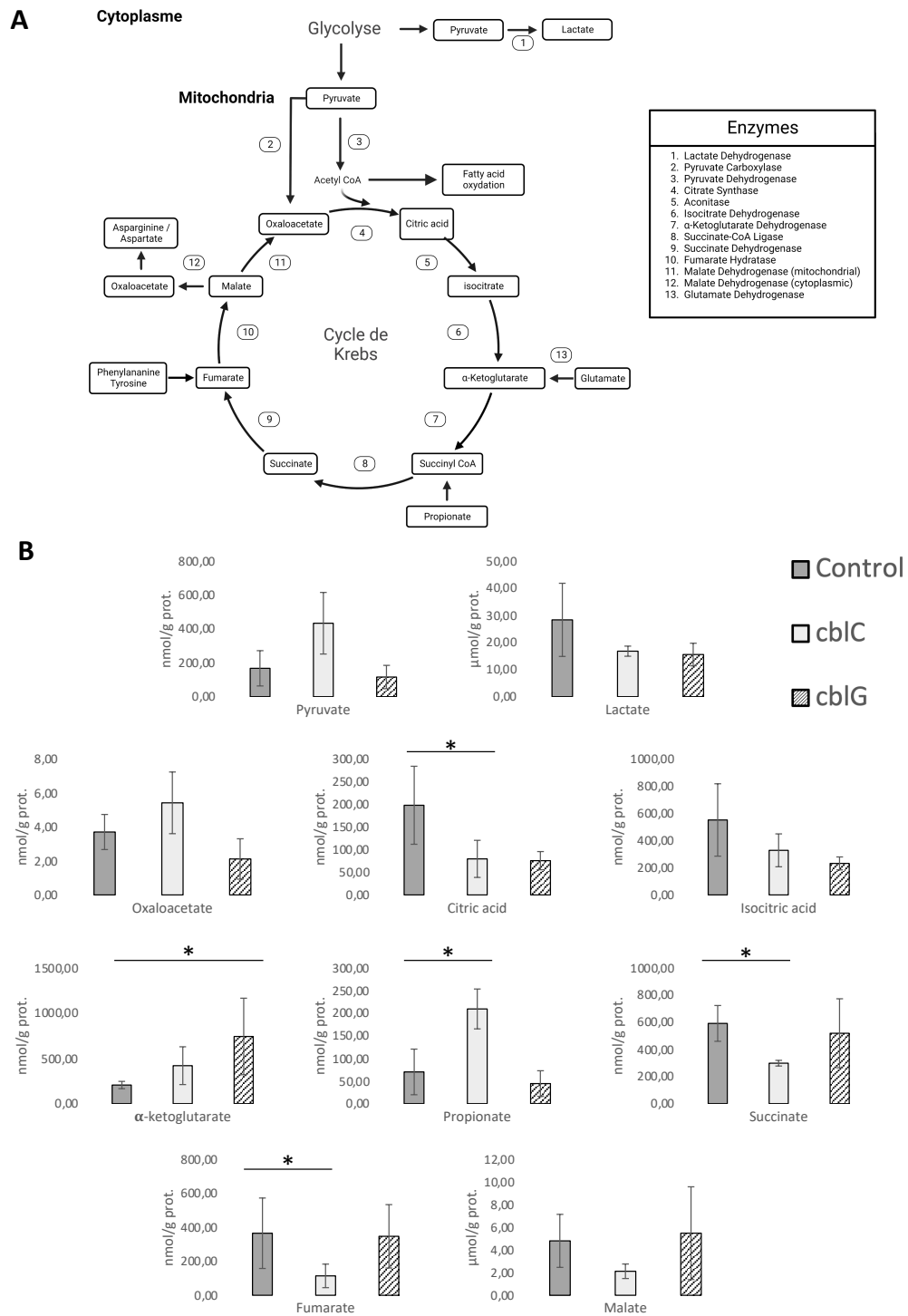


Figure 41. Analyse métabolique du cycle TCA dans les fibroblastes *cb1C* et *cb1G*.
(A). Représentation schématique du cycle TCA.
(B). Analyse métabolomique des métabolites du cycle TCA dans les fibroblastes *cb1C* et *cb1G* par LC-MS/MS. Test T de Student * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. N=4 à 5 par groupe.

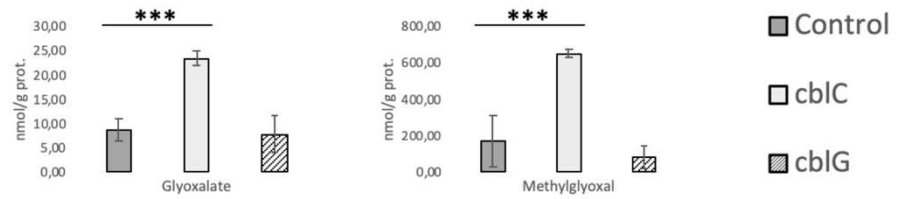
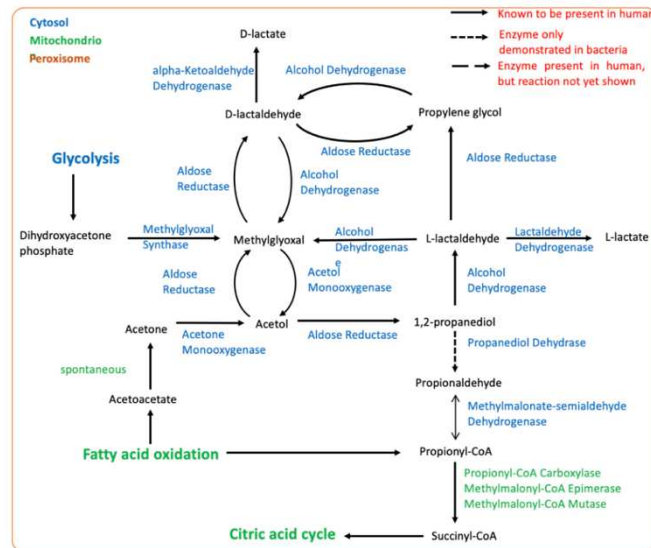
A**B**

Figure 42. Voie du méthylglyoxal

(A). Concentrations de méthylglyoxale et de glyoxalate dans les fibroblastes *cb1C* et *cb1G* par rapport aux cellules témoins, par LC-MS/MS. Test T de Student * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. N=4 à 5 par groupe.

(B). Voies métaboliques aboutissant à la synthèse de méthylglyoxal et donc à l'ajout post-traductionnel de propionaldéhyde.

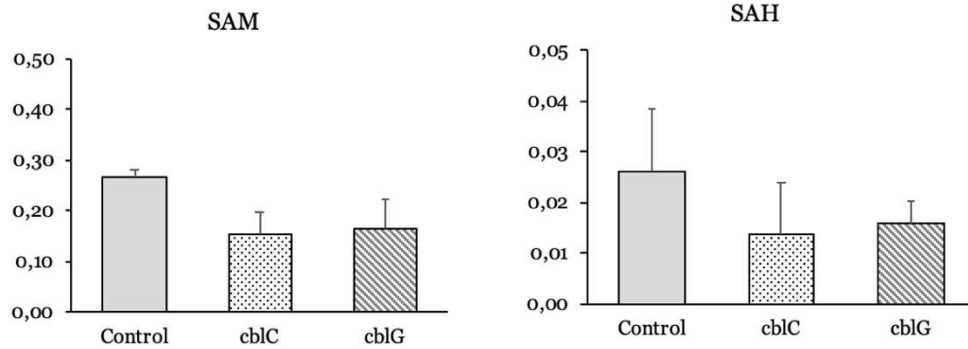


Figure 43. Concentration de SAM et de SAH dans des fibroblastes *cb1C* et *cb1G* comparés à des cellules témoins.
L'analyse a été réalisée par LC-MS/MS.

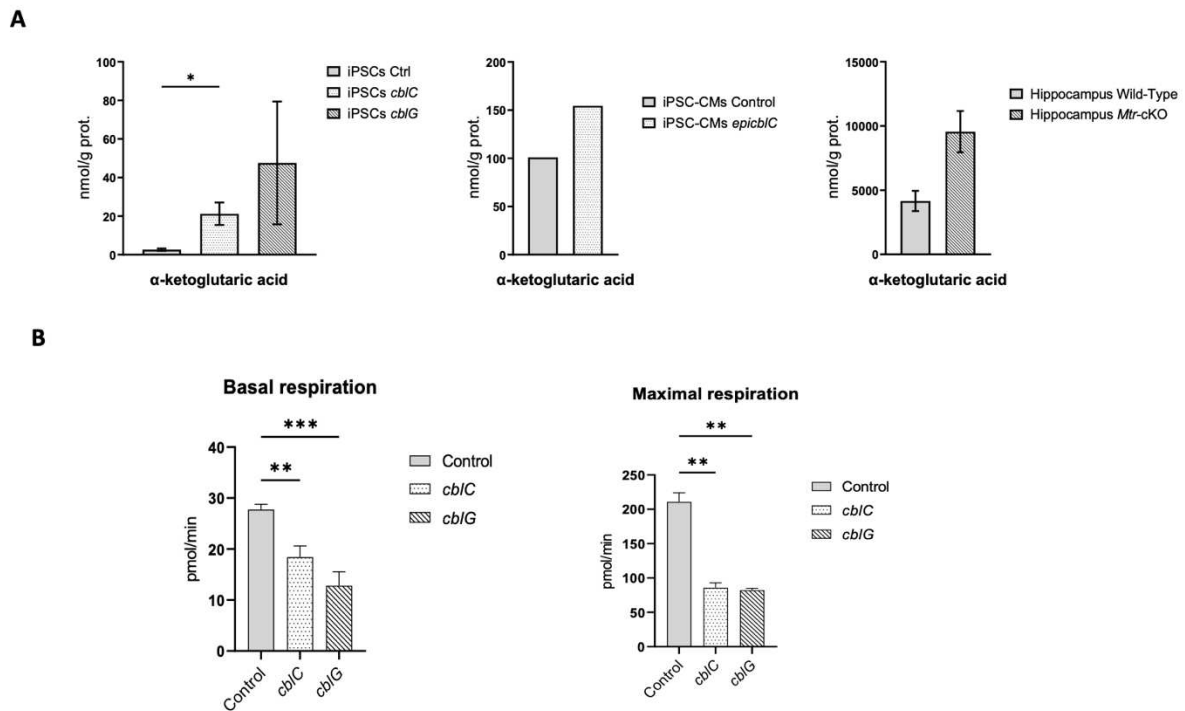


Figure 44. Altérations du cycle de Krebs dans des iPSC et de la respiration mitochondriale dans des fibroblastes *cb1C* et *cb1G*.

(A). Concentrations d' α -cétoglutarate dans des cellules souches pluripotentes induites (iPSC) et des iPSC différenciées en cardiomyocytes (iPSC-CM) issus de fibroblastes *cb1C* and *cb1G* comparés à des cellules contrôles, et dans l'hippocampes de souris MTR- (modèle décrit dans (317))

(B). Respiration mitochondriale dans des fibroblastes *cb1C* et *cb1G* comparés à des cellules contrôles

4.5.3 Étude transcriptomique : Identification des gènes différentiellement exprimés des enzymes métaboliques (Table 24).

Les transcriptomes des cellules *cb/C* et des cellules *cb/G* ont été comparés à celui des cellules témoins avec 3 répliques biologiques de chaque lignée cellulaire.

Dans les cellules *cb/C*/épi-*cb/C*, l'analyse a permis d'identifier 173 gènes dont l'expression est significativement différente (FDR<0,05 et un fold change >1,5 (FC)). 89 ont une expression diminuée et 84 ont une expression augmentée (**Figure 45, Table 25**). Parmi eux, 25 gènes codent pour des enzymes, dont 5 enzymes sont associées à des maladies annotées par OMIM avec des manifestations cliniques similaire à celles observées dans les IECM (**Table 24**). Ces gènes sont *MT-TT* (associé à une susceptibilité pour la maladie de Parkinson et à la myopathie mitochondriale infantile létale), *MT-TP* (associé à une susceptibilité pour la maladie de Parkinson et à la myopathie mitochondriale infantile létale), *OXCT1* (associé au déficit en succinyl CoA:3-oxoacide CoA transférase), *ACAT2* (associé au déficit en ACAT2) et *MT-CO1* codant pour une sous-unité de la cytochrome C oxydase.

Dans les cellules *cb/G*, l'analyse a identifié 183 gènes dont l'expression était significativement différente : 110 surexprimés et 73 diminués (FDR<0,05 et FC>1,5) (**Figure 45, Table 25**). Vingt-cinq gènes codaient pour des enzymes, dont 5 étaient associées à des maladies dont les manifestations cliniques sont également rapportées dans les IECM (**Table 24**). Ces gènes étaient *MT-TT*, *MT-TP*, *OXCT1*, *ACAT2* et *NOS3*.

Quatre gènes codant pour des enzymes étaient donc communs aux maladies de type *cb/C* et *cb/G* (*MT-TT*, *MT-TP*, *OXCT1* et *ACAT2*) (**Figure 46**). Les maladies monogéniques associées présentent des manifestations neurologiques (syndrome extrapyramidal, hypotonie, crises d'épilepsie, retard de développement) et une cardiomyopathie, mais aussi des manifestations ophtalmologiques (**Table 24**).

Table 24. Transcriptomique. Liste des gènes d'enzymes différentiellement exprimés dans les cellules *cbIC*, les cellules *cbIG* ou les fibroblastes des deux patients (FDR<0.05). Maladies associées à ces enzymes avec leur synopsis clinique et biochimique également observés dans les IEM B₁₂*.

Disease	Uniprot	Gene	Enzyme	OMIM number	Log2 (FC)	P-Value	Disease – OMIM – Transmission modality	Clinical synopsis also presents in IEM-B ₁₂ (frequency in IEM-B ₁₂ *)	Biochemical synopsis
<i>cbIC</i> and <i>cbIG</i>	Q9BWD1	ACAT2	Acetyl-CoA acetyltransferase 2	00678	<i>cbIC</i> : 1.64 <i>cbIG</i> : 1.27	1.03 x10 ⁻⁵ 1.24 x10 ⁻⁴	ACAT2 deficiency – 614055 - AR	Development delay (38.2%) Hypotonia (17.7%)	Lactic acidosis Increased pyruvate
<i>cbIC</i> and <i>cbIG</i>	/	MT-TT	tRNA threonine, mitochondrial	90090	<i>cbIC</i> : -2.8	4.46 x10 ⁻¹¹	Parkinson disease, susceptibility to – NA – NA	Extrapyramidal syndrome (3.6%)	Not specific
					<i>cbIG</i> : -3.1	2.26 x10 ⁻¹²	Lethal infantile mitochondrial myopathy - L IMM – 551000 – AR	Cardiomyopathy (3.3%)	Lactic acidosis
<i>cbIC</i> and <i>cbIG</i>	/	MT-TP	tRNA proline, mitochondrial	90075	<i>cbIC</i> : -1.57	1.62 x10 ⁻⁴	Parkinson disease, susceptibility to – NA – NA	Extrapyramidal syndrome (3.6%)	Not specific
					<i>cbIG</i> : -2.52	2.14 x10 ⁻⁷	Myoclonic epilepsy associated with ragged-red fibers; MERFF – 545000 - Mitochondrial	Seizures (10.6%) Pyramidal syndrome (4.4%)	Not specific
<i>cbIC</i> and <i>cbIG</i>	P55809	OXCT1	3-oxoacid CoA-transferase 1	01424	<i>cbIC</i> : -0.98 <i>cbIG</i> : -0.93	3.12 x10 ⁻⁵ 5.31 x10 ⁻⁵	Succinyl CoA:3-oxoacid CoA transferase deficiency – 245050 – AR	Hypotonia (17.7%)	Ketoacidotic episodes
<i>cbIC</i> and <i>cbIG</i>	P00395	MT-CO1	COX1 (MTCO1) cytochrome c oxidase subunit I	16030	<i>cbIC</i> : 0.75	2.21 x10 ⁻⁴	Leber optic atrophy – 535000 – Mitochondrial	Maculopathy (8.1%) Pyramidal syndrome (4.4%) Peripheral neuropathy (7.8%)	Not specific
							Sideroblastic anemia, acquired idiopathic – NA – NA	NA	Anemia
					<i>cbIG</i> : 0.7	3.64 x10 ⁻⁴	Cytochrome C oxidase deficiency – 220110 – Mitochondrial	Nystagmus (9.0%) Strabismus (3.2%) Cardiomyopathy (3.3%) Hypotonia (17.7%) Development delay (38.2%) Extrapyramidal syndrome (3.6%)	Lactic acidosis Ration lactate/pyruvate increased Acylcarnitine variable

							Myoglobinuria, recurrent – 550500 – Mitochondrial	NA	Not specific
<i>cbIG</i>	P29474	NOS3	Nitric oxide synthase 3	63729	-4.37	5.82 x10 ⁻⁴	Alzheimer disease, late-onset, susceptibility to – 104300 – AD	Extrapyramidal syndrome (3.6%) Psychiatric manifestation (6.3%)	Not specific
							Hypertension, pregnancy-induced – 189800 – AD	IUGR (1.8%) Seizures (10.6%)	HELLP syndrome
							Hypertension, susceptibility to – 145500 – Multifactorial	High blood pressure (2.6%)	Not specific
							Ischemic stroke, susceptibility to – 601367 – Multifactorial	No clinical similar clinical manifestations	Not specific
							Placental abruption		
Coronary artery spasm 1, susceptibility to									

Note: * Clinical and biochemical abnormalities observed in IEM-B₁₂ as reported in Wiedemann and al. 2022 meta-analysis (434).

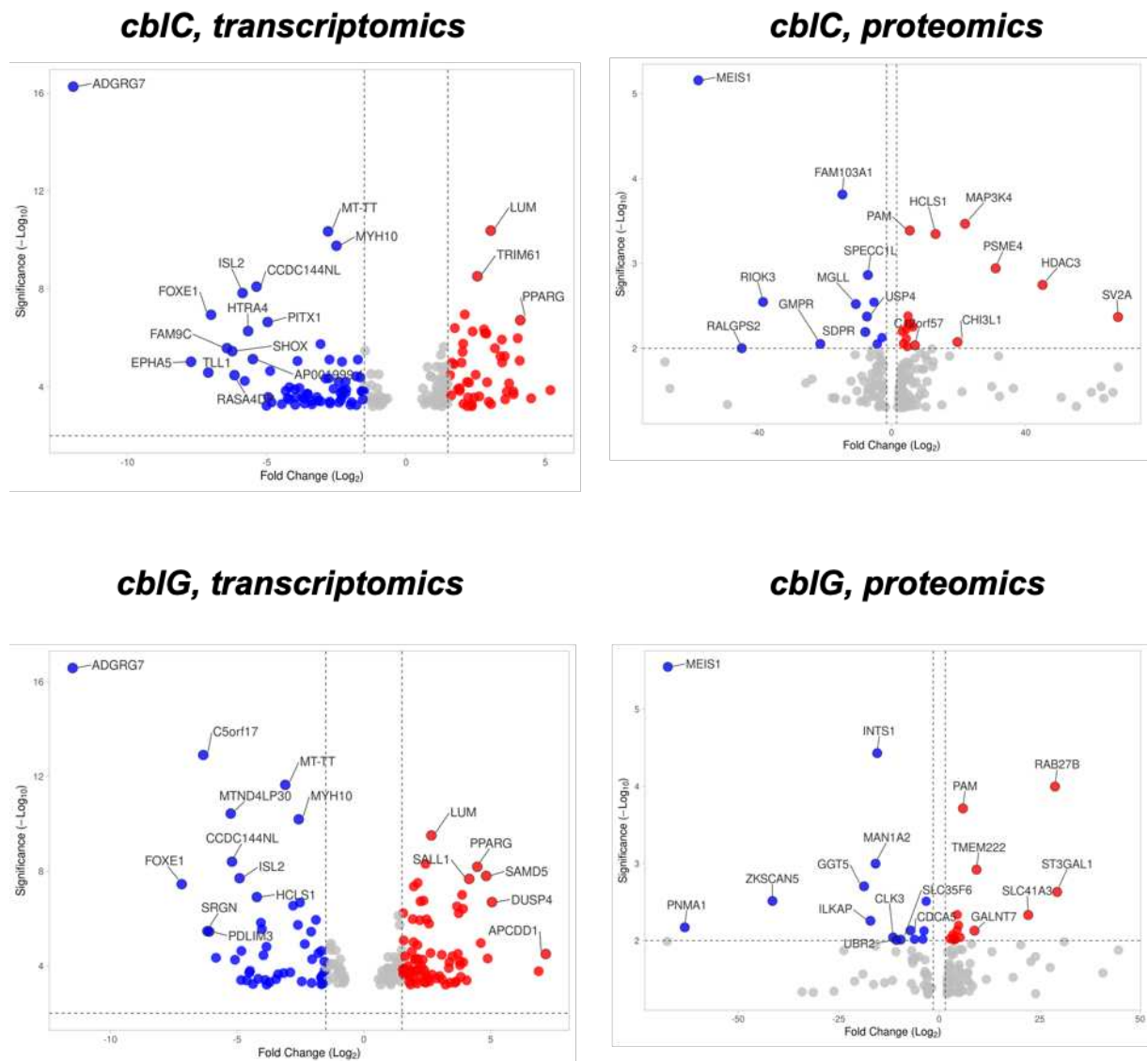


Figure 45. Vulcano-plot des analyses transcriptomiques et protéomiques dans les fibroblastes des types *cbIC* et *cbIG* d'erreurs innées du métabolisme de la cobalamine par rapport aux cellules témoins. Figures réalisées avec VolcanoR (447).

**Table 25. Liste complète des gènes différentiellement exprimés (classés par FC)
FDR<0,05.**

<i>cbIC-Gene</i>	Log2(FC)	P-value	FDR	<i>cbIG-Gene</i>	Log2 FC	P-value	FDR
<i>ADGRG7</i>	-11,95	5,45E-17	9,17E-13	<i>ADGRG7</i>	-11,48	2,63E-17	4,42E-13
<i>EPHA5</i>	-7,72	9,46E-06	3,38E-03	<i>FOXE1</i>	-7,18	3,55E-08	3,73E-05
<i>TLL1</i>	-7,1	2,61E-05	7,41E-03	<i>C5orf17</i>	-6,33	1,24E-13	6,97E-10
<i>FOXE1</i>	-7	1,14E-07	1,60E-04	<i>SRGN</i>	-6,17	3,42E-06	1,44E-03
<i>FAM9C</i>	-6,43	2,63E-06	1,44E-03	<i>PDLIM3</i>	-6,1	3,56E-06	1,44E-03
<i>SHOX</i>	-6,24	3,50E-06	1,78E-03	<i>LDHC</i>	-5,83	4,56E-05	1,01E-02
<i>RASA4DP</i>	-6,16	3,33E-05	8,54E-03	<i>MTND4LP30</i>	-5,25	3,70E-11	1,24E-07
<i>ISL2</i>	-5,87	1,48E-08	2,49E-05	<i>CCDC144NL</i>	-5,2	3,98E-09	7,43E-06
<i>HOXB-AS4</i>	-5,79	5,73E-05	1,17E-02	<i>INTS4P1</i>	-5,08	5,51E-05	1,10E-02
<i>HTRA4</i>	-5,67	5,29E-07	4,88E-04	<i>ISL2</i>	-4,9	1,99E-08	2,56E-05
<i>AP001999.1</i>	-5,5	7,37E-06	3,03E-03	<i>IRF6</i>	-4,84	3,98E-04	3,85E-02
<i>CCDC144NL</i>	-5,37	8,09E-09	1,51E-05	<i>FXYD6</i>	-4,83	2,34E-05	6,48E-03
<i>NRK</i>	-5,01	5,90E-04	4,73E-02	<i>WIPF3</i>	-4,62	4,10E-04	3,89E-02
<i>PITX1</i>	-4,97	2,25E-07	2,52E-04	<i>TLL1</i>	-4,52	1,96E-04	2,46E-02
<i>AC103702.2</i>	-4,95	2,59E-04	3,06E-02	<i>AC026355.1</i>	-4,49	1,62E-04	2,18E-02
<i>SRGN</i>	-4,88	2,25E-05	6,52E-03	<i>NOS3</i>	-4,37	5,82E-04	4,77E-02
<i>DNAH2</i>	-4,83	4,30E-04	3,93E-02	<i>HCLS1</i>	-4,22	1,24E-07	1,10E-04
<i>DSG3</i>	-4,46	5,08E-04	4,31E-02	<i>MYOCD</i>	-4,17	3,50E-04	3,52E-02
<i>LAMP3</i>	-4,32	1,46E-04	2,11E-02	<i>HTRA4</i>	-4,06	1,50E-06	7,21E-04
<i>PDLIM3</i>	-4,25	2,79E-04	3,14E-02	<i>FAM9C</i>	-4,02	2,81E-06	1,21E-03
<i>RBP7</i>	-4,19	1,04E-04	1,79E-02	<i>LINC00578</i>	-3,96	3,56E-05	8,67E-03
<i>DUXAP9</i>	-4,19	3,32E-04	3,39E-02	<i>DUXAP10</i>	-3,89	3,98E-04	3,85E-02
<i>AL110504.1</i>	-3,99	1,25E-04	1,98E-02	<i>AP001999.1</i>	-3,84	1,56E-05	4,85E-03
<i>AC026355.1</i>	-3,98	5,41E-04	4,46E-02	<i>AC002480.2</i>	-3,83	6,20E-04	4,95E-02
<i>LHX8</i>	-3,95	2,67E-04	3,11E-02	<i>EPHA5</i>	-3,71	4,86E-04	4,23E-02
<i>AC005082.1</i>	-3,9	8,82E-06	3,29E-03	<i>RBP7</i>	-3,46	3,63E-04	3,63E-02
<i>DUXAP8</i>	-3,83	1,12E-04	1,88E-02	<i>COL4A4</i>	-3,38	2,25E-04	2,68E-02
<i>ERBB4</i>	-3,71	2,72E-04	3,11E-02	<i>AC017048.3</i>	-3,16	2,02E-04	2,48E-02
<i>LINC02086</i>	-3,64	2,96E-04	3,23E-02	<i>MT-TT</i>	-3,1	2,26E-12	9,51E-09
<i>TMED10P2</i>	-3,64	4,83E-04	4,21E-02	<i>AL133346.1</i>	-2,9	1,88E-04	2,37E-02
<i>CDH10</i>	-3,55	1,89E-04	2,51E-02	<i>MTCO2P12</i>	-2,79	2,86E-07	2,00E-04
<i>DMD</i>	-3,53	1,95E-04	2,55E-02	<i>BMPR1B</i>	-2,6	1,87E-06	8,26E-04
<i>AL133346.1</i>	-3,38	3,87E-04	3,73E-02	<i>MYH10</i>	-2,57	6,45E-11	1,81E-07
<i>SOX9</i>	-3,38	5,20E-04	4,35E-02	<i>MT-TP</i>	-2,52	2,14E-07	1,56E-04
<i>PAX9</i>	-3,2	2,63E-04	3,09E-02	<i>TLE2</i>	-2,45	4,54E-04	4,07E-02
<i>C17orf107</i>	-3,15	3,69E-04	3,68E-02	<i>FMNL1</i>	-2,33	1,20E-05	3,96E-03
<i>MTND4LP30</i>	-3,07	1,79E-06	1,11E-03	<i>MTND1P23</i>	-2,08	3,61E-06	1,44E-03
<i>CHST6</i>	-3,06	3,90E-04	3,73E-02	<i>LINC01116</i>	-2,06	5,26E-04	4,44E-02
<i>WISP1</i>	-2,89	4,54E-05	1,00E-02	<i>HOXD9</i>	-2,04	5,22E-05	1,09E-02

<i>MT-TT</i>	-2,8	4,46E-11	1,50E-07	<i>AP005018.2</i>	-1,89	1,14E-06	5,82E-04
<i>ID4</i>	-2,77	4,48E-05	1,00E-02	<i>STK38L</i>	-1,79	2,90E-05	7,49E-03
<i>GRIK2</i>	-2,75	7,70E-06	3,03E-03	<i>GDNF</i>	-1,69	3,12E-04	3,28E-02
<i>FCRLA</i>	-2,74	4,02E-04	3,81E-02	<i>TNFRSF10A</i>	-1,68	2,35E-05	6,48E-03
<i>GATA2-AS1</i>	-2,73	4,80E-04	4,20E-02	<i>CPNE7</i>	-1,68	3,29E-04	3,43E-02
<i>NEK7</i>	-2,6	1,20E-04	1,95E-02	<i>PPP1R13L</i>	-1,68	5,98E-04	4,88E-02
<i>MYH10</i>	-2,5	1,73E-10	4,84E-07	<i>GFOD1</i>	-1,65	2,60E-04	2,91E-02
<i>CRHR1</i>	-2,42	6,05E-05	1,22E-02	<i>TNFAIP8L3</i>	-1,62	5,64E-04	4,65E-02
<i>PKDCC</i>	-2,41	4,36E-04	3,96E-02	<i>LINC00346</i>	-1,56	6,50E-05	1,23E-02
<i>RCAN1</i>	-2,35	1,79E-04	2,41E-02	<i>CMAHP</i>	-1,55	1,61E-04	2,18E-02
<i>ARHGDIB</i>	-2,34	3,44E-04	3,48E-02	<i>FHOD3</i>	-1,47	1,17E-04	1,90E-02
<i>MTCO2P12</i>	-2,3	9,41E-06	3,38E-03	<i>PLA2G4C</i>	-1,44	1,27E-04	1,95E-02
<i>STAT4</i>	-2,3	2,47E-04	2,99E-02	<i>MYEF2</i>	-1,42	4,12E-04	3,89E-02
<i>GSTO2</i>	-2,29	1,43E-04	2,10E-02	<i>FRMD5</i>	-1,4	8,90E-05	1,54E-02
<i>ITGA6</i>	-2,26	1,38E-04	2,05E-02	<i>CHST11</i>	-1,34	1,51E-05	4,80E-03
<i>BMPR1B</i>	-2,17	6,09E-05	1,22E-02	<i>GPAM</i>	-1,3	1,14E-05	3,83E-03
<i>AC120036.5</i>	-2,17	1,81E-04	2,41E-02	<i>TMSB4X</i>	-1,3	2,15E-05	6,23E-03
<i>SLC38A4</i>	-2,15	1,29E-04	1,98E-02	<i>SVIP</i>	-1,29	8,05E-05	1,44E-02
<i>MYH11</i>	-2	5,44E-04	4,46E-02	<i>NREP</i>	-1,26	3,03E-04	3,21E-02
<i>MATN3</i>	-1,96	4,23E-04	3,92E-02	<i>FLI1</i>	-1,2	8,29E-05	1,47E-02
<i>TNFRSF10A</i>	-1,79	3,72E-05	9,09E-03	<i>MTCO1P12</i>	-1,11	2,19E-05	6,24E-03
<i>TRIM14</i>	-1,78	5,55E-04	4,51E-02	<i>PLP2</i>	-1,06	1,10E-04	1,81E-02
<i>AP005018.2</i>	-1,73	7,76E-06	3,03E-03	<i>SMS</i>	-1,04	5,18E-04	4,40E-02
<i>TGOLN2</i>	-1,64	4,14E-05	9,65E-03	<i>HMG2P3</i>	-1,01	1,69E-04	2,18E-02
<i>MYEF2</i>	-1,6	1,50E-04	2,16E-02	<i>PCGF5</i>	-0,99	2,06E-04	2,51E-02
<i>MT-TP</i>	-1,57	1,62E-04	2,21E-02	<i>FOXP1</i>	-0,96	2,63E-04	2,93E-02
<i>CMAHP</i>	-1,55	3,32E-04	3,39E-02	<i>HYI</i>	-0,95	1,19E-04	1,90E-02
<i>STK38L</i>	-1,51	1,57E-04	2,16E-02	<i>OXCT1</i>	-0,93	5,31E-05	1,09E-02
<i>RGN</i>	-1,49	9,34E-05	1,67E-02	<i>HOXD8</i>	-0,92	2,26E-04	2,68E-02
<i>GPAM</i>	-1,47	3,33E-06	1,75E-03	<i>TTC3P1</i>	-0,89	1,48E-04	2,12E-02
<i>PLA2G4C</i>	-1,43	3,03E-04	3,24E-02	<i>ZNF281</i>	-0,83	5,28E-04	4,44E-02
<i>ALCAM</i>	-1,3	3,18E-04	3,34E-02	<i>PPP1R3B</i>	-0,79	2,58E-04	2,91E-02
<i>DNAJA4</i>	-1,26	2,99E-05	8,25E-03	<i>PMS2P1</i>	-0,79	4,80E-04	4,22E-02
<i>TRAF5</i>	-1,25	8,66E-05	1,58E-02	<i>PWP2</i>	-0,75	3,74E-04	3,70E-02
<i>AL512408.1</i>	-1,25	2,55E-04	3,05E-02	<i>NXPE3</i>	0,58	3,70E-04	3,68E-02
<i>FLNB</i>	-1,22	4,25E-04	3,92E-02	<i>DHRS4-AS1</i>	0,66	6,22E-04	4,95E-02
<i>CCNF</i>	-1,19	6,25E-04	4,91E-02	<i>MT-CO1</i>	0,7	3,46E-04	3,51E-02
<i>SVIP</i>	-1,11	3,65E-04	3,67E-02	<i>CDK20</i>	0,72	1,66E-04	2,18E-02
<i>CD99P1</i>	-1,06	4,16E-04	3,89E-02	<i>AC012467.2</i>	0,75	2,56E-04	2,91E-02
<i>FLI1</i>	-1,04	2,80E-04	3,14E-02	<i>AL596244.1</i>	0,9	3,01E-04	3,20E-02
<i>PCGF5</i>	-1,03	1,15E-04	1,89E-02	<i>ECM1</i>	0,91	4,18E-04	3,90E-02
<i>TMSB4X</i>	-1,02	3,77E-04	3,68E-02	<i>AS3MT</i>	0,92	1,97E-04	2,46E-02
<i>OXCT1</i>	-0,98	3,12E-05	8,32E-03	<i>ZADH2</i>	0,94	1,24E-04	1,93E-02

<i>MTCO1P12</i>	-0,95	2,32E-04	2,87E-02	<i>CCDC125</i>	0,94	1,30E-04	1,97E-02
<i>MYADM</i>	-0,94	5,76E-04	4,63E-02	<i>HEBP2</i>	0,96	4,19E-05	9,52E-03
<i>HYI</i>	-0,85	4,94E-04	4,28E-02	<i>DHX58</i>	0,98	1,32E-04	1,97E-02
<i>PWP2</i>	-0,8	2,99E-04	3,24E-02	<i>OSBPL1A</i>	1,06	4,24E-04	3,92E-02
<i>PGM2</i>	-0,79	3,71E-04	3,68E-02	<i>ZNF667</i>	1,06	6,17E-04	4,95E-02
<i>ANP32E</i>	-0,76	3,27E-04	3,37E-02	<i>EFNB1</i>	1,08	2,96E-04	3,16E-02
<i>RNASEH1-AS1</i>	-0,67	3,01E-04	3,24E-02	<i>OGFOD3</i>	1,09	2,28E-04	2,68E-02
<i>KIFAP3</i>	0,58	3,21E-04	3,35E-02	<i>LINC01270</i>	1,09	4,89E-04	4,24E-02
<i>TMEM30A</i>	0,61	1,17E-04	1,91E-02	<i>PTPRG</i>	1,14	1,32E-04	1,97E-02
<i>RALA</i>	0,67	5,03E-04	4,31E-02	<i>MTND2P28</i>	1,14	1,34E-04	1,97E-02
<i>MT-CO1</i>	0,75	2,21E-04	2,77E-02	<i>AK3</i>	1,16	2,70E-04	2,97E-02
<i>RNMT</i>	0,75	4,27E-04	3,92E-02	<i>ME1</i>	1,19	1,52E-04	2,13E-02
<i>OPTN</i>	0,77	1,55E-05	4,61E-03	<i>GSTM1</i>	1,21	4,27E-05	9,57E-03
<i>CCDC125</i>	0,87	3,74E-04	3,68E-02	<i>ACAT2</i>	1,27	1,24E-04	1,93E-02
<i>PYROXD2</i>	0,88	3,73E-05	9,09E-03	<i>HEPH</i>	1,28	6,49E-05	1,23E-02
<i>NTAN1</i>	0,89	3,67E-05	9,09E-03	<i>LRIG3</i>	1,3	3,32E-04	3,43E-02
<i>B9D1</i>	1,02	5,58E-04	4,51E-02	<i>PARD6G</i>	1,36	7,61E-07	4,26E-04
<i>GCLM</i>	1,04	3,84E-04	3,73E-02	<i>MLLT3</i>	1,41	1,87E-06	8,26E-04
<i>PYGL</i>	1,08	1,55E-04	2,16E-02	<i>DMGDH</i>	1,43	7,22E-05	1,30E-02
<i>IRF2BPL</i>	1,08	2,42E-04	2,97E-02	<i>COL6A3</i>	1,45	4,47E-04	4,06E-02
<i>HEBP2</i>	1,1	1,51E-05	4,61E-03	<i>PM20D2</i>	1,49	2,12E-05	6,23E-03
<i>ECM1</i>	1,1	9,72E-05	1,70E-02	<i>PLA2R1</i>	1,5	4,08E-05	9,38E-03
<i>AC106795.1</i>	1,1	3,06E-04	3,24E-02	<i>STARD9</i>	1,53	1,44E-04	2,10E-02
<i>OGFOD3</i>	1,1	4,10E-04	3,85E-02	<i>PYGL</i>	1,55	5,96E-07	3,59E-04
<i>STRADB</i>	1,11	5,29E-05	1,13E-02	<i>TRNP1</i>	1,55	2,09E-04	2,53E-02
<i>AC241585.2</i>	1,12	5,42E-04	4,46E-02	<i>HK2</i>	1,56	2,37E-04	2,73E-02
<i>OSBPL1A</i>	1,23	1,32E-04	1,99E-02	<i>CD40</i>	1,57	8,41E-06	3,01E-03
<i>RNF32</i>	1,24	5,41E-05	1,14E-02	<i>MRPS6</i>	1,58	1,29E-04	1,97E-02
<i>AS3MT</i>	1,25	4,94E-06	2,37E-03	<i>FBLN2</i>	1,61	1,78E-04	2,28E-02
<i>MLLT3</i>	1,26	1,55E-05	4,61E-03	<i>CLUHP3</i>	1,62	1,65E-04	2,18E-02
<i>MIR4458</i>	1,26	2,05E-04	2,61E-02	<i>SLC9A3-AS1</i>	1,63	3,96E-05	9,25E-03
<i>ACP6</i>	1,29	4,67E-04	4,13E-02	<i>AL139384.2</i>	1,7	2,41E-04	2,76E-02
<i>PAG1</i>	1,29	6,25E-04	4,91E-02	<i>TSHZ1</i>	1,74	2,26E-04	2,68E-02
<i>MTND2P28</i>	1,33	3,05E-05	8,27E-03	<i>BMPER</i>	1,76	1,03E-04	1,75E-02
<i>PARD6G</i>	1,35	2,33E-06	1,35E-03	<i>IFI44</i>	1,76	1,49E-04	2,12E-02
<i>PLA2R1</i>	1,36	1,96E-04	2,55E-02	<i>PRDM1</i>	1,79	4,82E-04	4,22E-02
<i>TMEM65</i>	1,36	4,47E-04	4,00E-02	<i>ARMC4</i>	1,82	1,68E-04	2,18E-02
<i>AC019069.1</i>	1,39	4,47E-04	4,00E-02	<i>SKIDA1</i>	1,82	2,87E-04	3,12E-02
<i>EHD3</i>	1,4	9,66E-05	1,70E-02	<i>THRB</i>	1,84	6,19E-04	4,95E-02
<i>CD40</i>	1,43	4,44E-05	1,00E-02	<i>BHMT2</i>	1,89	2,49E-05	6,63E-03
<i>PM20D2</i>	1,43	7,95E-05	1,47E-02	<i>EHD3</i>	1,93	1,06E-06	5,69E-04
<i>AK3</i>	1,45	1,47E-05	4,61E-03	<i>KREMEN1</i>	1,94	1,79E-04	2,28E-02
<i>IQCK</i>	1,49	1,54E-04	2,16E-02	<i>STK26</i>	1,96	9,96E-06	3,49E-03

<i>HK2</i>	1,49	4,71E-04	4,14E-02	<i>RAB36</i>	1,97	4,41E-08	4,36E-05
<i>EPHX1</i>	1,5	7,75E-05	1,46E-02	<i>IL16</i>	2,01	5,26E-05	1,09E-02
<i>OGFRL1</i>	1,58	3,35E-05	8,54E-03	<i>WNK3</i>	2,02	4,23E-04	3,92E-02
<i>SRPX2</i>	1,62	2,28E-04	2,84E-02	<i>SPON2</i>	2,03	5,15E-05	1,09E-02
<i>ACAT2</i>	1,64	1,03E-05	3,45E-03	<i>TP53I11</i>	2,04	1,57E-04	2,16E-02
<i>LAMC2</i>	1,72	1,19E-05	3,86E-03	<i>ADAMTS5</i>	2,07	1,58E-04	2,16E-02
<i>RAB36</i>	1,75	3,98E-07	4,18E-04	<i>AC245297.3</i>	2,09	5,62E-04	4,65E-02
<i>BMPER</i>	1,86	1,24E-04	1,98E-02	<i>COL24A1</i>	2,11	1,32E-05	4,28E-03
<i>HSD17B7</i>	1,92	1,13E-04	1,88E-02	<i>RASSF8</i>	2,12	3,15E-08	3,53E-05
<i>IFI44</i>	1,93	1,46E-04	2,11E-02	<i>CYP46A1</i>	2,13	4,98E-05	1,07E-02
<i>MRPS6</i>	1,99	1,02E-05	3,45E-03	<i>CDHR3</i>	2,15	7,08E-05	1,29E-02
<i>RHOU</i>	2,03	3,74E-06	1,85E-03	<i>ADCY4</i>	2,21	1,18E-06	5,82E-04
<i>CASC10</i>	2,05	1,73E-06	1,11E-03	<i>CASC10</i>	2,23	1,88E-07	1,51E-04
<i>CYGB</i>	2,06	4,97E-04	4,29E-02	<i>LIN7A</i>	2,26	2,73E-04	2,98E-02
<i>RASSF8</i>	2,11	1,11E-07	1,60E-04	<i>KCND1</i>	2,27	1,05E-04	1,75E-02
<i>CYP46A1</i>	2,19	6,31E-05	1,25E-02	<i>CPZ</i>	2,32	5,44E-05	1,10E-02
<i>PLXNB3</i>	2,2	6,10E-04	4,86E-02	<i>RHOU</i>	2,35	1,76E-07	1,48E-04
<i>ADRA2A</i>	2,23	2,71E-04	3,11E-02	<i>CAMK1D</i>	2,38	1,52E-04	2,13E-02
<i>TP53I11</i>	2,26	6,74E-05	1,30E-02	<i>AL035681.1</i>	2,39	4,82E-04	4,22E-02
<i>FAM19A2</i>	2,36	5,35E-04	4,45E-02	<i>TRIM61</i>	2,43	4,94E-09	8,30E-06
<i>CIPC</i>	2,36	6,18E-04	4,90E-02	<i>JAK3</i>	2,43	2,33E-04	2,70E-02
<i>ADCY4</i>	2,39	5,51E-07	4,88E-04	<i>PLPPR4</i>	2,44	5,17E-04	4,40E-02
<i>HUNK</i>	2,45	2,72E-04	3,11E-02	<i>SNHG5</i>	2,47	1,08E-06	5,69E-04
<i>CDHR3</i>	2,5	3,21E-05	8,42E-03	<i>OSBP2</i>	2,55	3,43E-04	3,50E-02
<i>TRIM61</i>	2,56	3,04E-09	6,38E-06	<i>TNFRSF21</i>	2,57	1,65E-06	7,70E-04
<i>FAM20A</i>	2,63	2,46E-04	2,99E-02	<i>SEMA6A</i>	2,6	4,55E-04	4,07E-02
<i>TNFRSF21</i>	2,8	4,50E-07	4,45E-04	<i>MAP2K6</i>	2,63	2,87E-05	7,49E-03
<i>SNHG5</i>	2,83	6,41E-07	5,35E-04	<i>LUM</i>	2,66	3,09E-10	6,50E-07
<i>IL16</i>	2,89	6,69E-07	5,35E-04	<i>KCNJ2</i>	2,68	2,32E-04	2,70E-02
<i>CAMK1D</i>	2,91	6,50E-05	1,27E-02	<i>FAM84A</i>	2,88	3,36E-04	3,44E-02
<i>KCNJ2</i>	2,97	4,06E-04	3,84E-02	<i>RCAN2</i>	2,98	2,67E-04	2,95E-02
<i>LUM</i>	3,04	4,15E-11	1,50E-07	<i>LYNX1</i>	3,07	3,43E-05	8,47E-03
<i>SBSN</i>	3,05	5,10E-04	4,31E-02	<i>GPRC5B</i>	3,08	3,76E-04	3,70E-02
<i>SALL1</i>	3,19	2,65E-06	1,44E-03	<i>INHBB</i>	3,22	6,22E-04	4,95E-02
<i>DAPK1</i>	3,39	5,62E-06	2,55E-03	<i>COL6A6</i>	3,35	1,23E-04	1,93E-02
<i>TMEM35A</i>	3,44	1,18E-06	8,24E-04	<i>PRSS35</i>	3,37	7,04E-05	1,29E-02
<i>LYNX1</i>	3,45	1,01E-05	3,45E-03	<i>CCDC102B</i>	3,4	5,13E-04	4,40E-02
<i>SAMD5</i>	3,54	5,57E-06	2,55E-03	<i>CDON</i>	3,49	3,91E-05	9,25E-03
<i>RCAN2</i>	3,56	3,26E-04	3,37E-02	<i>C1QTNF1</i>	3,59	5,17E-04	4,40E-02
<i>CDON</i>	3,62	1,57E-04	2,16E-02	<i>SIPA1L2</i>	3,64	4,57E-04	4,07E-02
<i>TRPV2</i>	3,7	7,18E-05	1,37E-02	<i>TMEM35A</i>	3,67	3,07E-07	2,07E-04
<i>COL6A6</i>	3,85	1,53E-04	2,16E-02	<i>SLC7A14</i>	3,71	3,11E-05	7,93E-03
<i>MLPH</i>	3,86	2,01E-04	2,59E-02	<i>DCN</i>	3,74	5,99E-07	3,59E-04

<i>DCN</i>	4,01	1,04E-06	7,93E-04	<i>OAS2</i>	3,78	6,47E-05	1,23E-02
<i>DUSP4</i>	4,08	8,53E-06	3,26E-03	<i>MLPH</i>	3,79	9,30E-05	1,59E-02
<i>PPARG</i>	4,1	1,90E-07	2,28E-04	<i>TRPV2</i>	3,82	2,91E-04	3,13E-02
<i>FAM213A</i>	4,49	2,95E-04	3,23E-02	<i>DAPK1</i>	3,87	1,00E-07	9,37E-05
<i>APOC1</i>	5,18	1,37E-04	2,05E-02	<i>FAM19A2</i>	3,91	3,89E-07	2,52E-04
				<i>ABCB4</i>	3,92	7,07E-05	1,29E-02
				<i>RAB27B</i>	4,05	4,07E-04	3,89E-02
				<i>SALL1</i>	4,15	2,13E-08	2,56E-05
				<i>PPARG</i>	4,47	6,53E-09	9,98E-06
				<i>FAM213A</i>	4,61	1,09E-05	3,73E-03
				<i>SAMD5</i>	4,82	1,59E-08	2,22E-05
				<i>SELENOP</i>	4,88	4,90E-05	1,07E-02
				<i>DUSP4</i>	5,05	2,03E-07	1,55E-04
				<i>THBS4</i>	6,89	1,68E-04	2,18E-02
				<i>APCDD1</i>	7,17	3,16E-05	7,94E-03

4.5.4 Étude protéomique : Identification des enzymes métaboliques différentiellement exprimées (Table 26).

Nous avons identifié 185 protéines différentiellement exprimées ($FC > 1,25$; $P < 0,05$) dans les cellules *cb/C* et 147 protéines dans les cellules *cb/G* (Figure 45 – Table 27). L'expression de 36 protéines était modifiée dans les deux maladies (Figure 46).

Dans les cellules *cb/C*, 42 enzymes sont exprimées de manière significativement différente par rapport aux cellules témoins. Nous avons identifié 9 enzymes (Table 24) associées à des maladies monogéniques, dont les manifestations cliniques sont également rapportées dans les IECM. Ainsi, nous pouvons rapporter l'alpha-1,2-mannosyltransférase (*ALG9*) associée au trouble congénital de la glycosylation de type II, et 3 enzymes mitochondriales: la sous-unité A8 de la NADH:ubiquinone oxydoréductase (*NDUFA8*), la Carnitine palmitoyltransférase 2 (*CPT2*) et la sous-unité X de l'ubiquinol-cytochrome c réductase, complexe III (*UQCR10*) associées à des maladies mitochondriales ayant un phénotype clinique sévère.

Dans les cellules *cb/G*, nous avons identifié 48 enzymes qui étaient exprimées différemment par rapport au groupe contrôle. Nous avons identifié 20 enzymes dans différentes voies métaboliques (Table 26), qui étaient associées à des maladies monogéniques avec des manifestations cliniques également rapportées dans les IECM. Parmi ces enzymes, nous avons identifié la protéine MMAA (*MMAA*), qui est impliquée dans le transport mitochondrial de la B₁₂ et associée au type *cb/A*. Nous avons également observé l'aminotransaminase 2 à chaîne ramifiée (*BCAT2*) et 6 enzymes mitochondriales, dont la carnitine palmitoyltransférase 2 (*CPT2*), 5 sous-unités de la NADH:ubiquinone oxydoréductase : A8 (*NDUFA8*), A11 (*NDUFA11*), A13 (*NDUFA13*), A2 (*NDUFA2*) et la protéine Fe-S de la NADH:ubiquinone oxydoréductase 3 (*NDUFS3*).

Dans les cellules *cb/C* et *cb/G*, nous avons identifié trois enzymes communes aux 2 pathologies qui étaient exprimées de manière différente par rapport aux fibroblastes témoins : *ALG9*, *STEAP3* et *NDUFA8* (Figure 46).

Table 26. Protéomique. Liste des enzymes différemment exprimées dans les cellules *cbIC*, *cbIG* ou les deux par rapport aux contrôles, (FC>1,25 ; valeur P<0,05). Maladie associée à ces enzymes avec leur synopsis clinique et biochimique également observés dans les IEM-B₁₂*.

Disease	Uniprot	Gene	Enzyme	OMIM number	Log2 (FC)	P-Value	Disease – OMIM – Transmission modality	Clinical synopsis also presents in IEM-B ₁₂ (frequency in IEM-B ₁₂ *)	Biochemical synopsis
<i>cbIC</i> and <i>cbIG</i>	Q9H6U8	ALG9	Alpha-1,2-mannosyltransferase	606941	cbIC: 2.66	0.024	Congenital disorder of glycosylation, type II – 608776 – AR	Microcephaly (2.9%) Cardiomyopathy (3.3%) Hypotonia (17.7%) Development delay (38.2%) Seizures (10.6%) Cerebral atrophy (29.7%) Abnormal brain MRI signal (50.1%)	Hypoglycosylation of serum transferrin
					cbIG: 2.51	0.022	Gillessen-Kaesbach-Nishimura syndrome; GIKANIS – 263210 – AR	Microcephaly (2.9%) Cardiomyopathy (3.3%)	Not specific
<i>cbIC</i> and <i>cbIG</i>	Q658P3	STEAP3	STEAP3 metalloredutase	609671	cbIC: 3.53	0.009	Anemia, hypochromic microcytic, with iron overload 2 – 615234 – AD	No clinical similar clinical manifestations	Anemia
					cbIG: 2.52	0.022			
<i>cbIC</i> and <i>cbIG</i>	P51970	NDUFA8	NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit A8	603359	cbIC: 2.14	0.040	Mitochondrial complex I deficiency, nuclear type 37 – 619272 – AR	Cardiomyopathy (3.3%) Pulmonary hypertension (1.9%) Development delay (38.2%) Hypotonia (17.7%) Cerebral atrophy (29.7%)	Elevated plasma lactate and pyruvate
					cbIG: 1.98	0.049			
<i>cbIC</i>	O15382	BCAT2	Branched chain aminotransaminase 2	113530	5.40	0.040	Hypervalinemia or hyperleucine-isoleucinemia 618850 – AR	Development delay (38.2%) Abnormal brain MRI signal (50.1%)	Plasma : Markedly increased valine and moderately increased leucine-isoleucine
<i>cbIC</i>	P23786	CPT2	Carnitine palmitoyltransferase 2	600650	-2.89	0.019	CPT II deficiency, infantile – 600649 - AR	Cardiomyopathy (3.3%) Hypotonia (17.7%) Seizures (10.6%)	Increase long-chain acylcarnitine (C14-C16) Hypoketotic hypoglycemia
							CPT II deficiency, lethal neonatal – 608836 – AR	Microcephaly (2.9%) Cardiomyopathy (3.3%) Chronic renal disease (7.0%) Hypotonia (17.7%) Seizures (10.6%)	Increase long-chain acylcarnitine (C14-C16) Decrease total and free carnitine

							Encephalopathy, acute, infection-induced, 4, susceptibility to – 614212 – AD, AR	Development delay (38.2%) Seizures (10.6%)	Increased serum acylcarnitine during febrile crisis (C14-C16)
							CPT II deficiency, myopathic, stress-induced – 255110 – AD, AR	NA	Rhabdomyolysis
<i>cbIC</i>	Q9H9P8	L2HGDH	L-2-hydroxyglutarate dehydrogenase	609584	4.70	0.047	L-2-hydroxyglutaric aciduria – 236792 – AR	Nystagmus (9.0%) Strabismus (3.2%) Development delay (38.2%) Seizures (10.6%) Pyramidal syndrome (4.4%) Extrapyramidal syndrome (3.6%) Cerebral atrophy (29.7%) Abnormal brain MRI signal (50.1%)	Increased L-2-hydroxyglutaric acid Increased lysine
<i>cbIC</i>	Q9NPF4	OSGEP	O-sialoglycoprotein endopeptidase	610107	-8.92	0.021	Galloway-Mowat syndrome 3 – 617729 – AR	IUGR (1.8%) Microcephaly (2.9%) Strabismus (3.2%) High blood pressure (2.6%) Hypotonia (17.7%) Development delay (38.2%) Seizures (10.6%) Pyramidal syndrome (4.4%) Cerebral atrophy (29.7%)	Proteinuria Hypoalbuminemia
<i>cbIC</i>	O75569	PRKRA	Protein activator of interferon induced protein kinase EIF2AK2	603424	2.83	0.049	Dystonia 16 – 612067 – AR	Pyramidal syndrome (4.4%) Extrapyramidal syndrome (3.6%) Development delay (38.2%)	Not specific
<i>cbIC</i>	Q9UDW1	UQCR10	Ubiquinol-cytochrome c reductase, complex III subunit X	609711	2.78	0.026	Mitochondrial complex III deficiency – NA – Mitochondrial	Mitochondrial dysfunction	Lactic acidosis
<i>cbIG</i>	P35573	AGL	Amylo-1,6-glucosidase, 4-alpha-glucanotransferase	610860	1.93	0.038	Glycogen storage disease IIIa – 232400 – AR Glycogen storage disease IIIb – 232400 – AR	Cardiomyopathy (3.3%)	Increased serum creatine kinase Hypoglycemia Hyperlipidemia
<i>cbIG</i>	Q9UBV7	B4GALT 7	Beta-1,4-galactosyltransferase 7	604327	-3.51	0.018	Ehlers-Danlos syndrome, spondylodysplastic type, 1 – 130070 – AR	Hypotonia (17.7%) Development delay (38.2%)	Not specific

<i>cbIG</i>	O14874	BCKDK	Branched-chain keto acid dehydrogenase kinase	614901	7.70	0.020	Branched-chain keto acid dehydrogenase kinase deficiency – 614923 - /	Seizures (10.6%) Development delay (38.2%)	Reduced branched-chain amino acid
<i>cbIG</i>	P32929	CTH	Cystathionine gamma-lyase	607657	7.52	0.045	Cystathioninuria – 219500 – AR	Development delay (38.2%)	Cystathionuria
<i>cbIG</i>	P11182	DBT	Dihydrolipoamide branched-chain transacylase	248610	3.17	0.033	Maple syrup urine disease, type II – 248600 – AR	Development delay (38.2%) Seizures (10.6%) Hypotonia (17.7%) Extrapyramidal syndrome (3.6%) Development delay (38.2%) Abnormal brain MRI signal (50.1%)	Ketosis +/- Lactic acidosis
<i>cbIG</i>	Q5JPH6	EARS2	Glutamyl-tRNA synthetase 2, mitochondrial	612799	-3.40	0.027	Combined oxidative phosphorylation deficiency 12 – 614924 – AR	Nystagmus (9.0%) Hypotonia (17.7%) Development delay (38.2%) Extrapyramidal syndrome (3.6%) Seizures (10.6%) Peripheral neuropathy (7.8%) Abnormal brain MRI signal (50.1%)	Decrease activity of complex I, III, IV Lactic acidosis
<i>cbIG</i>	Q14697	GANAB	Glucosidase, alpha, neutral AB	104160	2.43	0.037	Polycystic kidney disease 3 – 600666 – AR	High blood pressure (2.6%)	Not specific
<i>cbIG</i>	Q7LGA3	HS2ST1	Heparan sulfate 2-O-sulfotransferase 1	604844	-2.98	0.042	Neurofacioskeletal syndrome with or without renal agenesis; NFSRA – 619194 – AR	Development delay (38.2%)	Not specific
<i>cbIG</i>	Q81VH4	MMAA	Metabolism of cobalamin associated A	607481	11.72	0.032	Methylmalonic aciduria, vitamin B12-responsive, cblA type – 251100 – AR	cblA disease	cblA disease
<i>cbIG</i>	Q86Y39	NDUF A11	NADH-ubiquinone oxidoreductase subunit A11	612638	2.34	0.022	Mitochondrial complex I deficiency, nuclear type 14 – 618236 - AR	Microcephaly (2.9%) Nystagmus (9.0%) Cardiomyopathy (3.3%) Hypotonia (17.7%) Seizures (10.6%) Cerebral atrophy (29.7%)	Increase serum lactate and alanine
<i>cbIG</i>	Q9P0J0	NDUF A13	NADH-ubiquinone oxidoreductase subunit A13	609435	2.08	0.033	Mitochondrial complex I deficiency, nuclear type 28 – 618249 – AR	Maculopathy (8.1%) Nystagmus (9.0%) Hypotonia (17.7%) Development delay (38.2%) Pyramidal syndrome (4.4%)	Increase serum lactate
							Thyroid carcinoma, Hurthle cell	No clinical similar clinical manifestations	Not specific

							- 607464 - /		
<i>cbIG</i>	O43678	NDUF A2	NADH-ubiquinone oxidoreductase subunit A2	6002137	2.82	0.035	Mitochondrial complex I deficiency, nuclear type 13 - 618235 - AR	Cardiomyopathy (3.3%) Development delay (38.2%) Seizures (10.6%) Cerebral atrophy (29.7%) Abnormal brain MRI signal (50.1%)	Metabolic acidosis Increase serum lactate
<i>cbIG</i>	O75489	NDUFS3	NADH-ubiquinone oxidoreductase Fe-S Protein 3	603846	2.03	0.030	Mitochondrial complex I deficiency, nuclear type 8 - 618230 - AR	Extrapyramidal syndrome (3.6%) Development delay (38.2%)	Increase serum lactate
<i>cbIG</i>	Q15738	NSDHL	NAD(P)H steroid dehydrogenase-like protein	300275	2.34	0.022	CHILD syndrome - 308050 - XLD	IUGR (1.8%) Cardiomyopathy (3.3%) Development delay (38.2%)	Not specific
							CK syndrome - 300851 - XLR	Microcephaly (2.9%) Hypotonia (17.7%) Development delay (38.2%) Seizures (10.6%) Psychiatric manifestation (6.3%)	Not specific
<i>cbIG</i>	P12955	PEPD	Peptidase D	613230	2.53	0.019	Prolidase deficiency - 170100 - AR	Pulmonary hypertension (1.9%) Development delay (38.2%)	Anemia
<i>cbIG</i>	Q10713	PMPCA	Peptidase, mitochondrial processing, alpha	613036	2.05	0.046	Spinocerebellar ataxia, autosomal recessive 2 - 213200 - AR	Nystagmus (9.0%) Hypotonia (17.7%) Development delay (38.2%) Extrapyramidal syndrome (3.6%)	Not specific
<i>cbIG</i>	Q9H8P0	SRD5A3	Steroid 5-alpha-reductase 3	611715	4.73	0.022	Congenital disorder of glycosylation, type Iq - 612379 - AR	Nystagmus (9.0%) Development delay (38.2%) Hypotonia (17.7%)	Antithrombin deficiency
							Kahrizi syndrome - 612713 - AR	Development delay (38.2%)	Not specific

Note: * Clinical and biochemical abnormalities observed in IEM-B₁₂ are reported in Wiedemann and al. 2022 meta-analysis

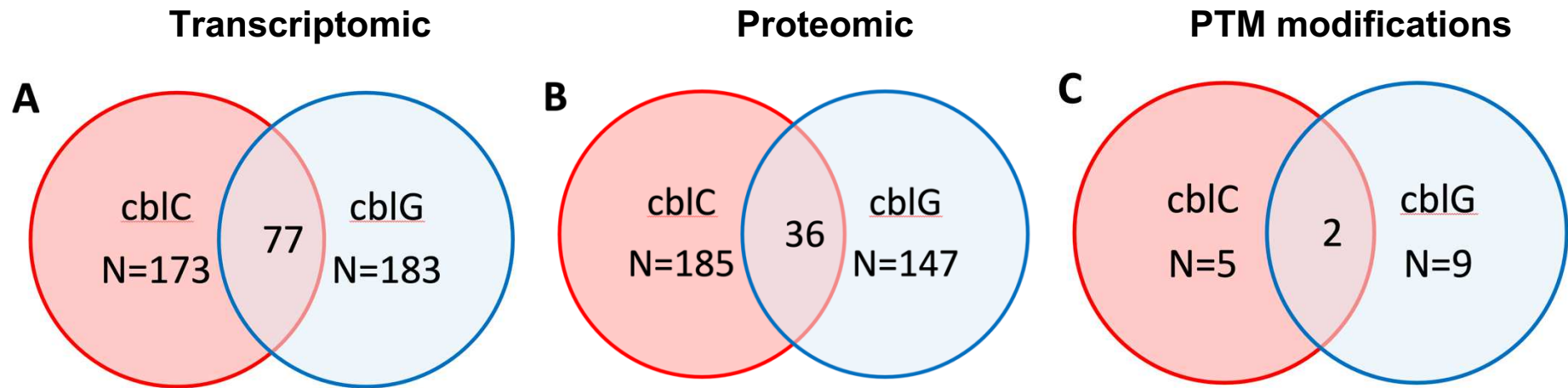


Figure 44. Similitudes et différences dans les analyses multi-omiques des fibroblastes *cb1C* et *cb1G* par rapport aux cellules témoins. **(A). Données transcriptomiques** : nous avons observé 173 gènes exprimés différemment dans les lignées *cb1C* et 183 dans les lignées *cb1G*, 77 sont en commun, mais seulement 5 enzymes métaboliques (MT-TT, MT-TP, MT-CO1, OXCT1 et ACAT2). **(B). Données protéomiques** : nous avons observé 185 protéines exprimées significativement différemment dans les lignées *cb1C* et 147 dans les lignées *cb1G*, 36 sont communes, 3 sont des enzymes métaboliques (ALG9, STEAP3 et NDUFA8). **(C). Modifications post-traductionnelles** : nous avons observé 5 modifications PTM significatives de protéines (FC>1,25, P-Value<0.05) dans les lignées *cb1C* et 9 dans les lignées *cb1G*, 2 sont communes (ARMCX1 et OAT).

Nous avons effectué une analyse de l'ontologie des gènes impactés au niveau transcriptomique et au niveau protéomique. Nous avons trié les termes GO par ordre décroissant d'enrichissement (**Figure 45A**). Dans les cellules *cb/C*, l'analyse a révélé un enrichissement (FDR<0,05) des gènes impliqués dans le processus catabolique des hexoses (FE : 7,34), la dégradation des acides gras (FE : 3,35), le métabolisme des acides monocarboxyliques (FE : 2,84), le métabolisme des acides carboxyliques (FE : 2,28) et le métabolisme des oxoacides (FE : 2,21). L'analyse des voies KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) a confirmé l'enrichissement de l'expression génétique sur les voies métaboliques de manière générale (FE : 1,82).

Les résultats diffèrent des données obtenues dans les cellules *cb/G*. Dans ces cellules, l'analyse a révélé un enrichissement (FDR<0,05) des gènes impliqués dans le métabolisme de l'homosérine (FE : 34,96), le métabolisme de la cystéine (FE : 21,52), le guidage des axones des cellules ganglionnaires dans la rétine (FE : 14,72), le métabolisme des monosaccharides (FE : 3,21), le métabolisme des acides gras (FE : 3,04), le métabolisme des acides monocarboxyliques (FE : 2,80), le métabolisme des acides carboxyliques (FE : 2,60) (**Figure 47B**). Les analyses des voies KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) ont révélé des modifications statistiquement significatives en lien avec la voie des phosphates pentoses (FE : 9,32), du métabolisme du saccharose (FE : 7,99), de la glycolyse/gluconéogenèse (FE : 5,22), la phosphorylation oxydative (FE : 3,65), la maladie de Parkinson (FE : 3,42), la maladie de Huntington (FE : 2,97) et la sclérose latérale amyotrophique (FE : 2,89) (**Figure 47C**).

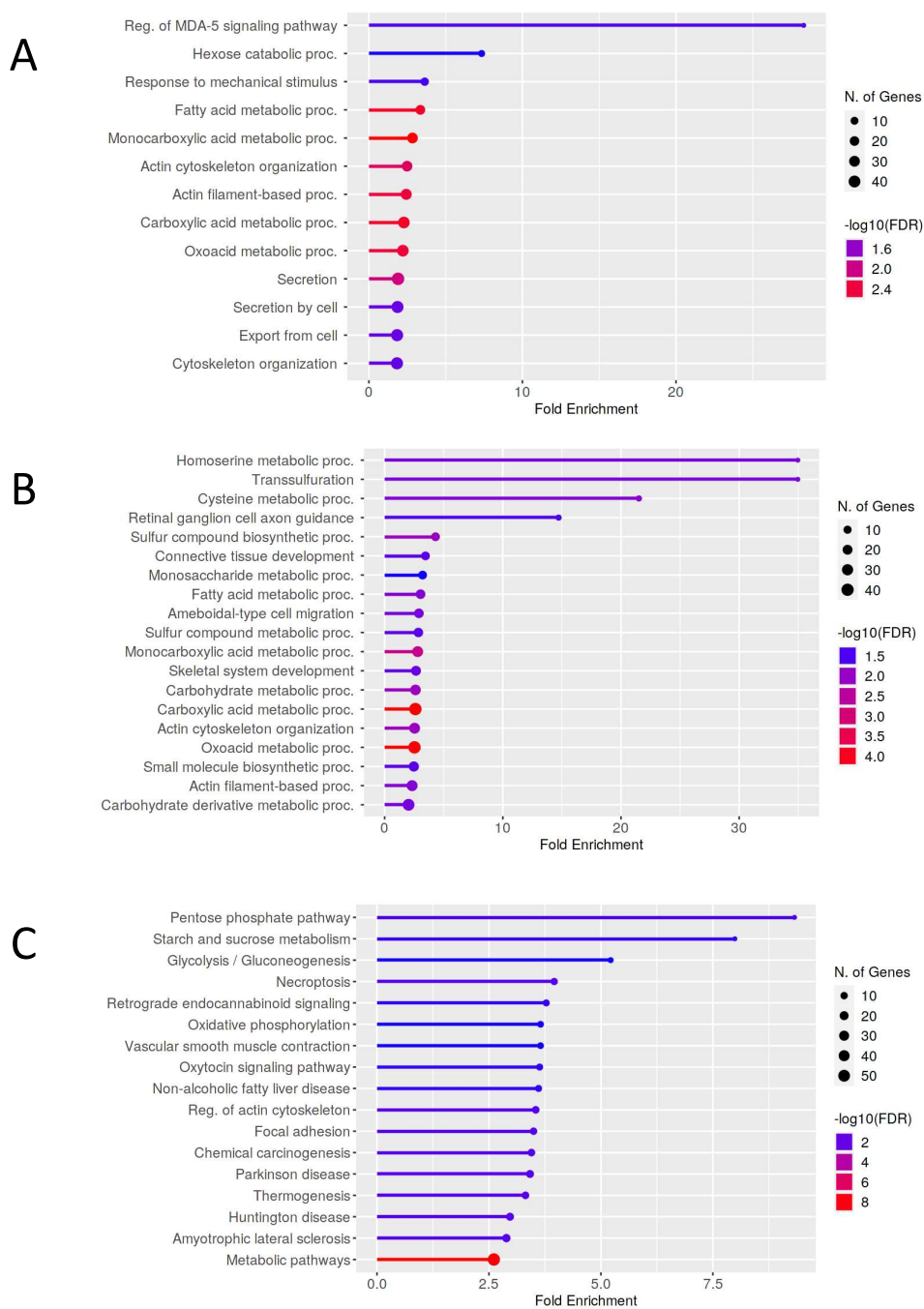


Figure 47. Analyse bioinformatique des gènes modifiés sur le plan transcriptomique et protéomique dans les fibroblastes des patients *cb1C* ou *cb1G*. N=3 par groupe. Réalisé avec ShinyGO. (A). Processus biologiques GO enrichis dans les fibroblastes *cb1C*. (B). Processus biologiques enrichis dans les fibroblastes *cb1G*. (C). Enrichissement les plus significatifs dans les fibroblastes *cb1G* (voies KEGG)

Table 27. Liste des protéines exprimées de manière significativement différente dans les cellules *cb1C* et *cb1G* par rapport aux contrôles (FC>1.25 ; P-value<0.05), triées par ordre alphabétique.

<i>cb1C</i> -Gene	Fold Change	P-Value	<i>cb1G</i> -Gene	Fold Change	P-Value
<i>ADD3</i>	2,405	0,04314975	<i>ACBD6</i>	-6,822	0,01353019
<i>AK6</i>	3,334	0,02206566	<i>ACIN1</i>	-2,719	0,04776736
<i>ALG9</i>	2,66	0,02452603	<i>AGL</i>	1,927	0,03757379
<i>ANKRD17</i>	7,716	0,01739288	<i>AHCYL1</i>	5,709	0,04504491
<i>ANXA5</i>	2,263	0,0287497	<i>AIG1</i>	-18,965	0,02721377
<i>APAF1</i>	6,327	0,00558762	<i>ALG9</i>	2,508	0,02183135
<i>ARHGEF18</i>	-13,556	0,04045329	<i>ANGEL2</i>	-2,877	0,04651188
<i>ARL2BP</i>	-2,132	0,04699226	<i>ANKRD17</i>	7,105	0,0265067
<i>ASAP3</i>	-5,864	0,03109287	<i>ANXA6</i>	2,271	0,03365528
<i>ATE1</i>	-16,982	0,03899521	<i>APAF1</i>	2,698	0,04626194
<i>ATP11C</i>	8,88	0,02978266	<i>ARHGEF18</i>	-16,326	0,03696799
<i>ATP1A1</i>	-5,344	0,02757355	<i>ATP5B</i>	2,209	0,035389
<i>BCAT2</i>	5,404	0,04019454	<i>B4GALT7</i>	-3,512	0,01777972
<i>BIRC6</i>	8,411	0,03562385	<i>BCAR1</i>	5,126	0,03758132
<i>BLOC1S3</i>	-2,886	0,01365309	<i>BCKDK</i>	7,698	0,01973941
<i>C12orf57</i>	6,951	0,00921367	<i>BTN3A3</i>	2,476	0,02938902
<i>C3orf58</i>	4,163	0,04698322	<i>C12orf57</i>	4,521	0,03567546
<i>C6orf120</i>	5,749	0,00516045	<i>C5orf51</i>	-10,764	0,01395162
<i>CANT1</i>	5,361	0,02302538	<i>C6orf120</i>	3,567	0,01504723
<i>CANX</i>	2,402	0,04431892	<i>CARM1</i>	2,043	0,04535328
<i>CARM1</i>	2,451	0,02864892	<i>CASP4</i>	-6,778	0,01744048
<i>CCAR1</i>	2,604	0,03217626	<i>CCDC43</i>	5,223	0,00909321
<i>CD99L2</i>	-5,694	0,03660005	<i>CDC26</i>	-31,323	0,04694143
<i>CDC26</i>	-66,183	0,02965358	<i>CDCA5</i>	-7,131	0,00739781
<i>CERS2</i>	-2,51	0,03072149	<i>CERCAM</i>	3,376	0,00841384
<i>CHI3L1</i>	19,674	0,00841757	<i>CERS2</i>	-2,058	0,04040346
<i>CHM</i>	6,427	0,02588023	<i>CHMP5</i>	2,689	0,02196066
<i>CLIC2</i>	10,617	0,0245465	<i>CHRM2</i>	23,978	0,04878347
<i>CNN1</i>	-3,827	0,02009545	<i>CLK3</i>	-11,448	0,00909801
<i>COG4</i>	4,167	0,03843123	<i>CRIP2</i>	3,403	0,03187314
<i>COMMD1</i>	-7,434	0,04333094	<i>CTH</i>	7,52	0,0452855
<i>CPQ</i>	-2,632	0,0243914	<i>CUL4A</i>	2,136	0,01390179
<i>CPT2</i>	-2,891	0,01866541	<i>DAAM2</i>	-67,667	0,01024205
<i>CRIP2</i>	3,359	0,03140458	<i>DBT</i>	3,167	0,03277427
<i>CSPP1</i>	-6,295	0,02389666	<i>DDX24</i>	-11,614	0,03291175
<i>CSTF2</i>	-5,998	0,01051364	<i>DNPH1</i>	2,652	0,03737707
<i>CUL4B</i>	-3,259	0,01459668	<i>DSEL</i>	4,948	0,02056069

<i>DAAM2</i>	-67,667	0,01446148	<i>EARS2</i>	-3,399	0,02666982
<i>DBR1</i>	-3,612	0,0114212	<i>ELP6</i>	8,293	0,03887796
<i>DCN</i>	2,871	0,04646029	<i>ENPP2</i>	4,847	0,04711135
<i>DECR2</i>	12,029	0,01015366	<i>ENSA</i>	3,535	0,00921557
<i>DGAT1</i>	-16,946	0,03800488	<i>EXOSC2</i>	-3,244	0,00309291
<i>DHRS1</i>	9,547	0,01748067	<i>FBXL18</i>	-2,798	0,04934834
<i>DHX40</i>	10,253	0,04902194	<i>FTH1</i>	3,816	0,03357282
<i>DNAJC21</i>	7,285	0,02468844	<i>GALNT7</i>	8,778	0,00744737
<i>DNPEP</i>	2,346	0,04247401	<i>GANAB</i>	2,432	0,03747743
<i>DSEL</i>	10,494	0,01372484	<i>GCC2</i>	44,572	0,01331596
<i>EHHADH</i>	-3,318	0,02845444	<i>GFM2</i>	4,427	0,00736584
<i>EIF1AD</i>	1,765	0,04875688	<i>GGT5</i>	-18,689	0,00198098
<i>EIF4B</i>	-3,861	0,04884238	<i>GIT2</i>	2,337	0,02539764
<i>ENDOG</i>	6,92	0,01306691	<i>GPHN</i>	13,08	0,01392581
<i>ENSA</i>	4,899	0,00415591	<i>H6PD</i>	2,477	0,03717205
<i>ERLIN2</i>	-1,845	0,04910396	<i>HECTD3</i>	3,032	0,03576603
<i>EXOC6B</i>	2,26	0,03384959	<i>HIST1H1A</i>	-6,577	0,01966762
<i>EXOSC2</i>	-2,453	0,01575214	<i>HMGB2</i>	2,669	0,02614848
<i>FAM103A1</i>	-14,685	0,00015405	<i>HNRNPL</i>	3,306	0,01281202
<i>FRMD8</i>	-12,132	0,02436165	<i>HS2ST1</i>	-2,981	0,04178651
<i>FUBP3</i>	-4,274	0,00886425	<i>HTATSF1</i>	5,734	0,02862809
<i>GAK</i>	3,139	0,00630815	<i>IGLL1</i>	22,796	0,01871935
<i>GALM</i>	2,462	0,02603392	<i>ILKAP</i>	-17,109	0,00554017
<i>GALNT7</i>	5,388	0,0375301	<i>INTS1</i>	-15,414	3,72E-05
<i>GEMIN5</i>	-5,277	0,00285596	<i>IRF2BP2</i>	2,686	0,03668026
<i>GFM2</i>	5,118	0,00521753	<i>ITM2B</i>	2,367	0,04632309
<i>GGT5</i>	-5,854	0,01980484	<i>JAM3</i>	5,459	0,0417289
<i>GHDC</i>	4,206	0,04869609	<i>KIAA1217</i>	-3,777	0,03820005
<i>GMPR</i>	-21,298	0,00886316	<i>KIF1B</i>	5,094	0,02501615
<i>GNL3</i>	-6,39	0,01261206	<i>LMAN2</i>	2,409	0,04031013
<i>HCLS1</i>	13,119	0,00044996	<i>LSAMP</i>	5,321	0,02687531
<i>HDAC3</i>	45,057	0,00178832	<i>MAB21L1</i>	-26,183	0,04535513
<i>HDAC5</i>	31,938	0,01233439	<i>MAN1A2</i>	-15,825	0,00100591
<i>HEATR1</i>	5,758	0,0184454	<i>MED24</i>	40,727	0,02624209
<i>HEATR5A</i>	4,378	0,00766368	<i>MEIS1</i>	-67,497	2,83E-06
<i>HMGB3</i>	-3,746	0,04659542	<i>MGLL</i>	-6,141	0,00962347
<i>HMSD</i>	12,213	0,01637171	<i>MGST1</i>	-3,645	0,02690319
<i>HNRNPL</i>	4,284	0,00599167	<i>MMAA</i>	11,724	0,03177006
<i>ILKAP</i>	-4,035	0,01622882	<i>MROH1</i>	-3,517	0,02511982
<i>INTS1</i>	3,455	0,02213375	<i>MRPS16</i>	-23,714	0,013446
<i>IRF2BP2</i>	2,576	0,04973048	<i>MYO1D</i>	2,268	0,03155722
<i>KIF1BP</i>	3,421	0,04999548	<i>NDUFA11</i>	2,341	0,02173799
<i>KPTN</i>	-4,78	0,02369444	<i>NDUFA13</i>	2,077	0,03271678

<i>KRR1</i>	4,047	0,04183936	<i>NDUFA2</i>	2,82	0,03521359
<i>KRT1</i>	3,021	0,01657266	<i>NDUFA8</i>	1,976	0,04957869
<i>KRT2</i>	9,307	0,01756823	<i>NDUFB5</i>	2,395	0,04050946
<i>L2HGDH</i>	4,698	0,04688874	<i>NDUFS3</i>	2,033	0,03034376
<i>LMOD1</i>	-8,242	0,02440267	<i>NOMO2</i>	2,146	0,03278017
<i>LPIN1</i>	7,579	0,04650853	<i>NSDHL</i>	2,337	0,02209027
<i>LRRC14</i>	3,781	0,02404221	<i>OSM</i>	-3,786	0,00747765
<i>LSM7</i>	-4,801	0,03692628	<i>PAFAH1B3</i>	-2,975	0,03135194
<i>MAP3K4</i>	21,915	0,00034119	<i>PAM</i>	5,903	0,00019358
<i>MBD2</i>	-2,309	0,0474444	<i>PEPD</i>	2,527	0,01949068
<i>MEIS1</i>	-57,706	6,9707E-06	<i>PGM5</i>	5,258	0,04622517
<i>MGLL</i>	-10,683	0,00300504	<i>PIGG</i>	23,958	0,01612618
<i>MIA3</i>	3,232	0,03707688	<i>PIGU</i>	20,282	0,0113482
<i>MLEC</i>	-2,871	0,0074687	<i>PLA2G4A</i>	3,638	0,00979637
<i>MLXIPL</i>	-3,334	0,02690825	<i>PLEKHF1</i>	4,497	0,04591628
<i>MMGT1</i>	2,355	0,03963614	<i>PMPCA</i>	2,052	0,04631427
<i>MOXD1</i>	4,131	0,04532483	<i>PNMA1</i>	-63,287	0,00673732
<i>MRPL17</i>	55,14	0,048209	<i>POGZ</i>	-5,994	0,04383895
<i>MUC6</i>	-6,547	0,0297581	<i>PPP1R12C</i>	-2,996	0,0395701
<i>N4BP1</i>	7,576	0,03891186	<i>PPP1R15A</i>	-13,572	0,03534316
<i>NAALADL2</i>	-7,197	0,03479829	<i>PRPF38B</i>	-6,261	0,01780548
<i>NDUFA8</i>	2,142	0,03970696	<i>PSMB7</i>	2,094	0,04268056
<i>NDUFB1</i>	3,082	0,02569374	<i>PSMG3</i>	-1,913	0,04066892
<i>NFKBIA</i>	2,903	0,0484272	<i>PYGL</i>	2,667	0,00947239
<i>NHSL1</i>	5,022	0,04791801	<i>RAB27B</i>	28,802	0,00010091
<i>NOLC1</i>	62,534	0,02823924	<i>RALGPS2</i>	-21,03	0,03362034
<i>NOMO2</i>	2,396	0,02880706	<i>ROR1</i>	6,843	0,03234245
<i>NPR2</i>	17,288	0,01230068	<i>RTN3</i>	4,683	0,03369055
<i>NUDT16</i>	4,863	0,03471196	<i>SCCPDH</i>	2,112	0,03541592
<i>OSGEP</i>	-8,922	0,02119945	<i>SELENOO</i>	5,705	0,01313553
<i>OSM</i>	-3,397	0,04559044	<i>SH3PXD2B</i>	3,076	0,01499262
<i>PAM</i>	5,416	0,00040918	<i>SLC16A1</i>	-15,829	0,01176024
<i>PDS5A</i>	-4,45	0,01609297	<i>SLC16A7</i>	2,567	0,04228888
<i>PDZD8</i>	66,077	0,03297989	<i>SLC2A6</i>	2,754	0,04607854
<i>PFDN1</i>	-8,347	0,04115422	<i>SLC35F6</i>	-9,595	0,00971061
<i>PHLDA2</i>	2,85	0,0188602	<i>SLC39A7</i>	2,131	0,03409971
<i>PHYHD1</i>	21,005	0,03236321	<i>SLC41A3</i>	22,14	0,00465849
<i>PIGG</i>	36,324	0,02957263	<i>SLC7A14</i>	31,07	0,01034884
<i>PLA2G4A</i>	2,677	0,03462382	<i>SLIT2</i>	7,128	0,02588962
<i>PPP1R11</i>	-3,741	0,01248672	<i>SNF8</i>	3,99	0,00968527
<i>PPP1R12C</i>	-3,181	0,04445082	<i>SPATA18</i>	2,835	0,03487863
<i>PRKRA</i>	2,827	0,04852757	<i>SRD5A3</i>	4,729	0,02247945
<i>PRPF39</i>	50,668	0,03779448	<i>SRRT</i>	4,816	0,00634628

<i>PSMB10</i>	3,922	0,02383088	<i>ST3GAL1</i>	29,324	0,00234246
<i>PSMB7</i>	2,848	0,0329785	<i>STARD13</i>	-6,884	0,03613796
<i>PSME4</i>	31,043	0,00114078	<i>STEAP3</i>	2,518	0,02156951
<i>PTPRH</i>	63,327	0,03878346	<i>STEAP4</i>	7,399	0,03425431
<i>QPCTL</i>	-4,652	0,01879642	<i>SVEP1</i>	-2,853	0,02831006
<i>RALGPS2</i>	-44,726	0,00996552	<i>TBCK</i>	-3,064	0,03979948
<i>RBBP4</i>	-3,557	0,03849603	<i>TGM2</i>	-4,06	0,00960503
<i>RBBP9</i>	4,691	0,00952905	<i>THTPA</i>	-34,102	0,04628241
<i>REPS1</i>	3,431	0,04601998	<i>TIMM23B</i>	3,4	0,02764024
<i>RGS10</i>	2,909	0,02397686	<i>TM9SF1</i>	8,024	0,01106408
<i>RINT1</i>	6,238	0,04763218	<i>TMEM222</i>	9,282	0,00120339
<i>RIOK3</i>	-38,375	0,0028406	<i>TP53BP2</i>	-2,82	0,04940008
<i>RNF123</i>	2,692	0,02170818	<i>TRAPPC12</i>	2,512	0,02541276
<i>ROR1</i>	12,443	0,01433139	<i>TRIM47</i>	-5,019	0,01613001
<i>RRAGC</i>	2,098	0,03849192	<i>TRIP4</i>	4,476	0,00461577
<i>SDPR</i>	-7,863	0,00641276	<i>TSPAN4</i>	5,131	0,01300589
<i>SEMA3C</i>	-23,764	0,022964	<i>TTC7A</i>	3,293	0,04635635
<i>SERPINB2</i>	4,909	0,0159352	<i>UBE2D1</i>	2,373	0,04671879
<i>SGCE</i>	-17,704	0,03807388	<i>UBR2</i>	-10,648	0,00983506
<i>SH3PXD2B</i>	3,211	0,01725107	<i>USP4</i>	-5,892	0,01684306
<i>SLC16A1</i>	-9,258	0,04208523	<i>USP47</i>	-2,539	0,04032972
<i>SLC22A4</i>	67,667	0,01662111	<i>ZADH2</i>	27,592	0,02235375
<i>SLC2A10</i>	4,427	0,01442201	<i>ZKSCAN5</i>	-41,475	0,00306556
<i>SLC2A6</i>	3,086	0,02543355	<i>ZRANB2</i>	18,375	0,0299994
<i>SLC35B1</i>	4,218	0,03808373			
<i>SLC39A11</i>	10,139	0,01221588			
<i>SLC39A7</i>	2,467	0,02669026			
<i>SLC41A3</i>	14,994	0,04634154			
<i>SLC46A3</i>	-4,188	0,02734297			
<i>SMPDL3A</i>	-25,641	0,0256613			
<i>SNF8</i>	3,484	0,01546748			
<i>SPECC1L</i>	-7,083	0,00136877			
<i>SPTBN1</i>	2,59	0,04221097			
<i>SRGAP1</i>	2,541	0,04919517			
<i>ST3GAL1</i>	29,901	0,02818477			
<i>STARD13</i>	-10,365	0,031752			
<i>STEAP3</i>	3,528	0,00880625			
<i>STEAP4</i>	9,799	0,0342715			
<i>SUPT4H1</i>	59,649	0,03287775			
<i>SV2A</i>	67,588	0,00427386			
<i>SYT11</i>	5,353	0,01519173			
<i>THOC2</i>	-2,656	0,02830058			
<i>THTPA</i>	-49,01	0,0459202			

<i>TMEM22</i>	4,973	0,01568274
<i>TMEM87A</i>	-2,736	0,02824961
<i>TRAPPC12</i>	2,8	0,01930289
<i>TRAPPC2</i>	-7,073	0,03011683
<i>TRIP4</i>	5,024	0,00516211
<i>TRMT2A</i>	5,188	0,0415056
<i>TSPAN4</i>	8,622	0,01132946
<i>TUBB2A</i>	3,47	0,03334431
<i>UBASH3B</i>	2,841	0,04684632
<i>UBE2D1</i>	3,247	0,03427178
<i>UBR2</i>	-10,877	0,01190115
<i>UQCR10</i>	2,778	0,02608851
<i>USP4</i>	-7,365	0,00421297
<i>VKORC1</i>	2,213	0,03231254
<i>VPS29</i>	5,145	0,02107717
<i>VPS37A</i>	3,515	0,03103587
<i>WDR92</i>	2,473	0,02668201
<i>ZADH2</i>	32,211	0,03678953
<i>ZKSCAN5</i>	-2,95	0,03433731

4.5.5 Modifications post-traductionnelles (Table 28).

Nous avons émis l'hypothèse qu'une partie des altérations métaboliques, y compris l'hyperammoniémie, l'hyperglycinémie et la diminution de la concentration d'ornithine, pouvaient être liées à des modifications post-traductionnelles sur des enzymes impliquées dans les différents cycles. Nous avons observé une acylation accrue des résidus lysine a type d'acétylation, de propionylation, de succinylation/méthylmalonylation, de glutarylation et de malonylation dans des protéines clés des voies métaboliques (Table 29). L'analyse des séquences par spectrométrie de masse des peptides ayant un ajout significatif de PTM sont présentées dans la Figure 48A. Nous avons identifié 4 protéines exprimées (TUBB3, WASHC4, OAT et SPTAN1) avec des PTM significativement différent des fibroblastes témoins ($FC > 1,25$; valeur $P < 0,05$) dans les cellules *cb/C* et 9 protéines (WASHC4, SF1, COL6A1, COL6A3, TTL, OAT, RPS27A, EZR et TUBB3) dans les cellules *cb/G* (Table 30). 2 protéines (WASHC4 et OAT) avaient une PTM similaire dans les deux pathologies (Figure 47C).

Dans les fibroblastes *cb/C*, nous avons observé des PTM de type addition du propionaldéhyde sur 2 enzymes, l'ornithine aminotransférase (OAT, sur un résidu histidine en position 53) et la spectrine alpha non érythrocytaire 1 respectivement codées par les gènes *OAT* et *SPTAN1*. Le déficit d'expression ou d'activité de ces protéines en cas de maladies monogéniques produit des manifestations cliniques neurologiques ou ophtalmologiques telles que la dégénérescence chorio-rétinienne ou la cécité, également rapportées dans les C-IECM (Table 28 et Figure 48A). Les cas d'apparition néonatale du déficit en OAT rapportent un retard de croissance, un retard de développement et une encéphalopathie.

Dans les fibroblastes de type *cb/G*, nous avons observé des PTM sur 5 protéines codées par des gènes associés à des maladies monogéniques, avec des manifestations cliniques (neurologiques ou ophtalmologiques) également rapportées dans les C-IECM (Table 28). Plus précisément, nous avons observé une addition de propionaldéhyde dans l'ornithine aminotransférase (OAT), le collagène de type VI, chaîne alpha 1 (COL6A1) et la tubuline beta 3 classe III (TUBB3), et une addition de succinyle sur le collagène de type V, chaîne alpha 1 (COL5A1) (Table 28 et Figure 48A).

Ces données ont montré la prédominance des PTM par propionaldéhydratation (Table 29). Cette constatation était cohérente avec l'augmentation intracellulaire du

propionate et de méthylglyoxal. En effet l'ajout de propionaldéhyde sur l'OAT (**Table 28 et Figure 48B**), et la baisse d'activité qui en résulte est cohérent avec la diminution de la concentration d'ornithine signalée dans les cas P1, P2 et P4 et l'augmentation de la glutamine dans le cas P1. L'addition de groupements propionaldéhyde dans l'OAT était plus importante dans les fibroblastes de patients suivi pour un déficit de type *cb/C* que dans les fibroblastes *cb/G* (**Figure 48B**). L'analyse en composantes principales (ACP) des PTM de l'OAT a montré un regroupement selon les cellules témoins, *cb/C* et *cb/G*, illustrant les différences de PTM dans les deux catégories d'IECM (**Figure 48C**).

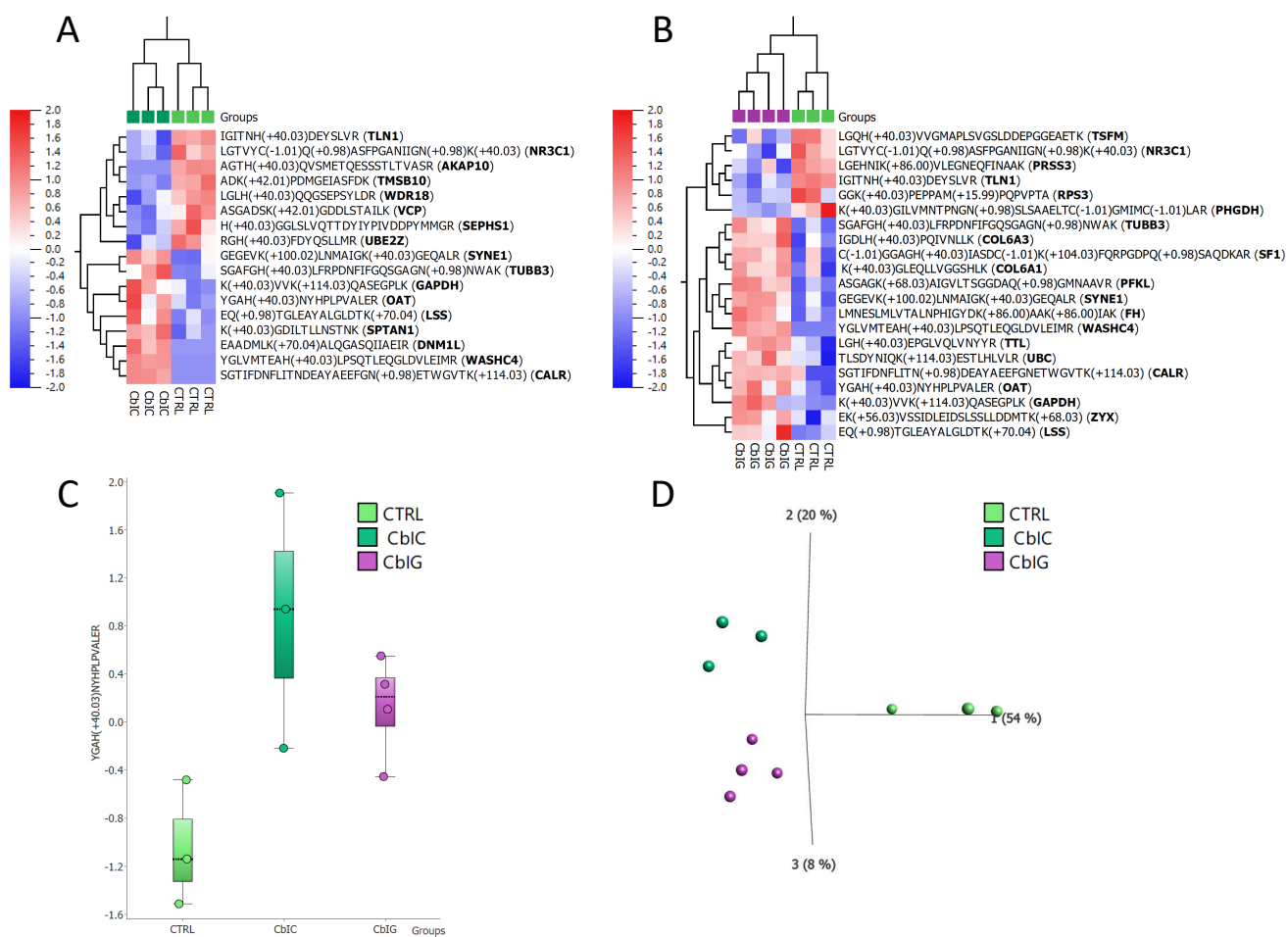


Figure 48. Modifications post-traductionnelles (PTM) dans les protéines des fibroblastes des patients *cbIC* et *cbIG*.

(A). Heatmap et séquences de peptides avec des PTMs significatives dans les fibroblastes *cbIC* par rapport au contrôle (pvalue<0.05).

(B). Heatmap et séquences de peptides avec PTMs significatifs dans les fibroblastes *cbIG* vs Contrôle (pvalue<0.05).

(C). Importance des modifications par l'addition de groupement propionaldéhyde rapportée dans les fibroblastes des patients *cbIC* et *cbIG* sur l'ornithine aminotransférase.

(D). Analyse en composantes principales des peptides modifiés avec un filtrage multigroupe ANOVA à p<0,05 dans les fibroblastes des patients *cbIC* et *cbIG* et les fibroblastes témoins

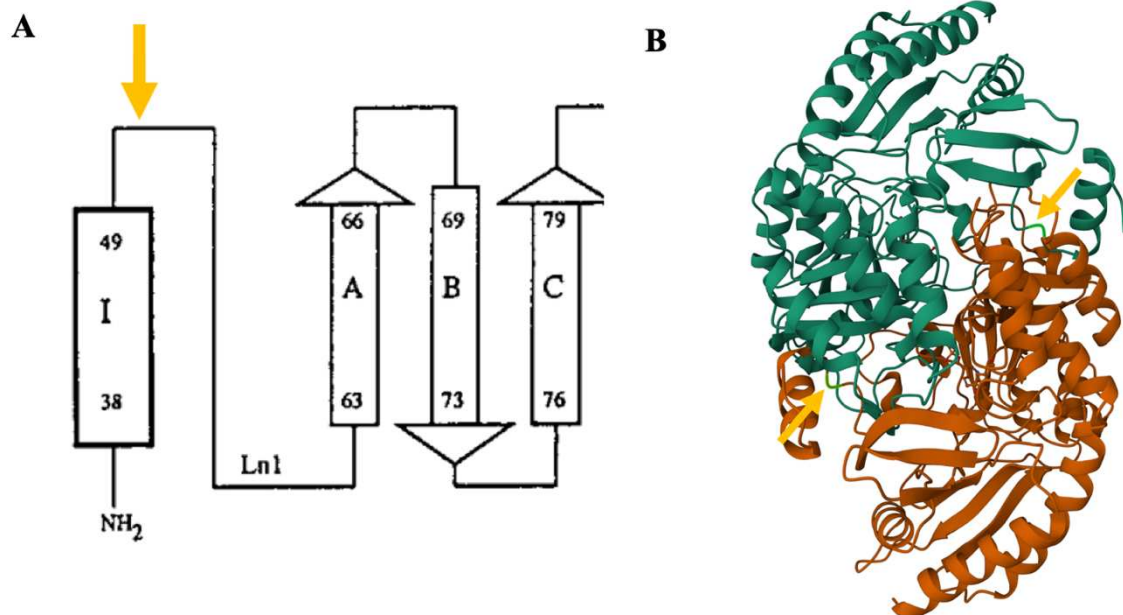


Figure 49. Représentation tridimensionnelle de la protéine OAT et localisation du PTM observé dans des fibroblastes *cb1C* et *cb1G*

(A). Le segment N-terminal de l'ornithine amino-transférase (OAT) se compose d'une hélice isolée (L) et d'une bande antiparallèle à trois brins β (A, B, C) reliées par une longue boucle (Ln1). La modification post-traductionnelle (PTM) de l'OAT est située sur l'histidine 53, dans la première boucle de la sous-unité A, entre deux résidus fortement impliqués dans l'interface avec la sous-unité B (flèches). La structure 3D a été réalisée selon (448), avec le

(B). La PTM est censée perturber la dimérisation des deux sous-unités et donc l'activité catalytique de l'OAT.

Table 28. PTM. Liste et type de modifications post-traductionnelles des enzymes exprimées dans les cellules CbIC, les cellules CbIG ou les deux défauts par rapport aux témoins (FC>1,25 ; valeur P<0,05). Une maladie liée à ces enzymes avec leur synopsis clinique et biochimique a également été observée dans les ICEM *.

Disease PTM modification	Uniprot	Gene	Enzyme	OMIM number	Fold change	P-Value	Disease – OMIM – Transmission modality	Clinical synopsis also presents in IEM-B ₁₂ (frequency in IEM-B ₁₂ *)	Biochemical synopsis																																						
cbIC and cbIG Propionaldehyde addition	P04181	OAT	Ornithine aminotransferase	613349	cbIC: 1.699	0.048	Gyrate atrophy of choroid and retina; GACR – 258870 – AR	Maculopathy (8.1%) Peripheral neuropathy (7.8%)	Increase or decrease Ornithine level																																						
					cbIG: 1.363	0.022				cbIC Propionaldehyde addition	Q13813	SPTAN1	Spectrin, alpha, nonerythrocytic 1; SPTAN1	182810	1.654	0.008	Developmental and epileptic encephalopathy 5; DEE5 – 613477 – AD	Microcephaly (2.9%) Seizures (10.6%) Hypotonia (17.7%) Cerebral atrophy (29.7%)	Not specific	cbIG Propionaldehyde addition	P12109	COL6A1	Collagen, type VI, alpha 1	120220	2.371	0.046	Bethlem myopathy 1; BTHLM1 – 158810 – AD, AR	Hypotonia (17.7%)	Increase serum creatine kinase	Ullrich congenital muscular dystrophy 1; UCMD1 – 254090 – AD, AR	Hypotonia (17.7%) Peripheral neuropathy (7.8%)	Increase serum creatine kinase	cbIG Propionaldehyde addition	Q13509	TUBB3	Tubulin beta 3 class III	602661	6.665	0.017	Cortical dysplasia, complex, with other brain malformations 1; CDCBM1 – 614039 – AD.	Nystagmus (9.0%) Strabismus (3.2%) Development delay (38.2%) Hypotonia (17.7%) Pyramidal syndrome (4.4%) Seizures (10.6%) Abnormal brain MRI signal (50.1%)	Not specific	Fibrosis of extraocular muscles, congenital, 3a, with or without extraocular involvement; CFEOM3A – 600638 – AD.	Development delay (38.2%) Peripheral neuropathy (7.8%)	Not specific	cbIG Succinyl	P20908
cbIC Propionaldehyde addition	Q13813	SPTAN1	Spectrin, alpha, nonerythrocytic 1; SPTAN1	182810	1.654	0.008	Developmental and epileptic encephalopathy 5; DEE5 – 613477 – AD	Microcephaly (2.9%) Seizures (10.6%) Hypotonia (17.7%) Cerebral atrophy (29.7%)	Not specific																																						
cbIG Propionaldehyde addition	P12109	COL6A1	Collagen, type VI, alpha 1	120220	2.371	0.046	Bethlem myopathy 1; BTHLM1 – 158810 – AD, AR	Hypotonia (17.7%)	Increase serum creatine kinase																																						
							Ullrich congenital muscular dystrophy 1; UCMD1 – 254090 – AD, AR	Hypotonia (17.7%) Peripheral neuropathy (7.8%)	Increase serum creatine kinase																																						
cbIG Propionaldehyde addition	Q13509	TUBB3	Tubulin beta 3 class III	602661	6.665	0.017	Cortical dysplasia, complex, with other brain malformations 1; CDCBM1 – 614039 – AD.	Nystagmus (9.0%) Strabismus (3.2%) Development delay (38.2%) Hypotonia (17.7%) Pyramidal syndrome (4.4%) Seizures (10.6%) Abnormal brain MRI signal (50.1%)	Not specific																																						
							Fibrosis of extraocular muscles, congenital, 3a, with or without extraocular involvement; CFEOM3A – 600638 – AD.	Development delay (38.2%) Peripheral neuropathy (7.8%)	Not specific																																						
cbIG Succinyl	P20908	COL5A1	Collagen type V alpha 1 chain	120215	1.548	0.035	Ehlers-Danlos syndrome, classic type, 1; EDSC1 – 130000 – AD	Hypotonia (17.7%)	Not specific																																						

addition							Fibromuscular dysplasia, multifocal; FMDMF – 619329 – AD	No clinical manifestations	similar clinical	Not specific
cbIG Propionaldehyde addition	P12111	COL6A3	Collagen type VI alpha 3 chain	120250	1.775	0.024	Bethlem myopathy 1; BTHLM1 – 158810 – AD, AR	Hypotonia (17.7%)		Increase serum creatine kinase
							Ullrich congenital muscular dystrophy 1; UCMD1 – 254090 – AD, AR	Hypotonia (17.7%)		Increase serum creatine kinase
							Dystonia 27 – 616411 – AR	Extrapyramidal syndrome (3.6%)		Not specific

Note: * Clinical and biochemical abnormalities observed in IEM-B₁₂ are reported in Wiedemann and al.

Table 29: Liste des modifications post-traductionnelles (PTM) observées dans les fibroblastes de patients *cb/C* et *cb/G*.

Name	Dmass	Position	#PSM	#Peptides
Deamidation	0,98	QN	23411	3953
Oxidation	15,99	M	16215	917
Half of a disulfide bridge	-1,01	C	4386	740
Propionaldehyde	40,03	KH	2467	463
Acetylation	42,01	K	173	96
Glutarylation	114,03	K	161	56
Crotonylation	68,03	K	71	61
Propionyl	56,03	K	64	58
Succinyl	100,02	K	55	41
Malonylation	86	K	50	47
Benzoyl	104,03	K	47	34
Crotonaldehyde	70,04	K	31	25
Butyryl	70,04	K	31	28
Palmitoylation	238,23	K	12	9
Myristoylation	210,2	K	12	9

Table 30. Liste des modifications PTM des enzymes métaboliques dans les cellules *cbIC* et *cbIG* par rapport aux contrôles (FC>1,25), triée par indice alphabétique. Les gènes dont la *P*-Value est < 0,05 sont écrits en caractères gras.

UniProt	<i>cbIC</i> -Gene	PTM	<i>P</i> -value	Fold change	UniProt	<i>cbIG</i> -Gene	PTM	<i>P</i> -value	Fold change
Q9P291	ARMCX1	Acrolein addition	0.037	3.911	P53396	ACLY	Propionaldehyde	0.108	1.776
Q05682	CALD1	Acrolein addition	0.119	2.594	P63261	ACTG1	Propionaldehyde; Ubiquitin	0.113	4.622
O15484	CAPN5	Propionaldehyde	0.104	14.265	P54886	ALDH18A1	Propionaldehyde	0.137	1.738
Q9Y5P4	CERT1	Ubiquitin	0.115	1.702	P04075	ALDOA	Propionaldehyde; Deamidation	0.118	18.159
Q07065	CKAP4	Succinic anhydride labeling reagent light; Crotonaldehyde	0.137	3.275	Q9P291	ARMCX1	Acrolein addition	0.047	5.561
P20908	COL5A1	Succinic anhydride labeling reagent light; Half of a disulfide bridge	0.113	5.856	O15484	CAPN5	Propionaldehyde	0.117	2.842
P12109	COL6A1	Propionaldehyde	0.145	2.775	P40227	CC6TA	Propionaldehyde	0.129	2.451
P53621	COPA	Propionaldehyde	0.142	6.842	P30085	CMPK1	Propionaldehyde	0.113	1.539
P19525	EIF2AK2	Acrolein addition	0.068	1.654	P20908	COL5A1	Succinic anhydride labeling reagent light; Half of a disulfide bridge	0.035	1.548
Q5VTE0	EEF1A1P5	Ubiquitin; Deamidation	0.133	1.699	P12109	COL6A1	Propionaldehyde	0.046	2.371
Q6P179	ERAP2	Propionaldehyde	0.117	1.384	P12111	COL6A3	Propionaldehyde	0.024	1.775
P15311	EZR	Propionaldehyde	0.040	6.591	P00387	CYB5R3	Propionaldehyde	0.060	6.280
Q92616	GCN1	Propionaldehyde	0.061	19.611	Q16531	DDB1	Crotonaldehyde; Acrolein addition	0.141	1.536
Q16777	H2AC20	Propionaldehyde; Ubiquitin	0.078	1.703	Q14204	DYNC1H1	Propionaldehyde	0.077	1.826
A1L0T0	ILVBL	Propionaldehyde	0.095	109.540	Q5VTE0	EEF1A1P5	Ubiquitin; Deamidation	0.072	2.562
P04181	OAT	Propionaldehyde	0.048	1.988	Q6P179	ERAP2	Propionaldehyde	0.052	> 20
P08237	PFKM	Propionaldehyde	0.142	2.906	Q02790	FKBP4	Propionaldehyde	0.098	1.687
P18669	PGAM1	Ubiquitin	0.101	2.696	Q16777	H2AC20	Acetylation; Carboxyethyl	0.086	3.295
Q15149	PLEC	Propionaldehyde	0.136	4.367	Q16836	HADH	Carboxyethyl	0.096	1.413
Q96D15	RCN3	Propionaldehyde	0.064	1.735	P17693	HLA G	Ubiquitin; Acetylation	0.099	1.707
P62979	RPS27A	Ubiquitin	0.059	1.687	Q13151	HNRNPA0	Deamidation; Ubiquitin	0.144	1.486
Q13813	SPTAN1	Propionaldehyde	0.008	5.226	Q93052	LPP	Propionaldehyde	0.000	> 20
Q9UH99	SUN2	Acetylation; Ubiquitin	0.140	3.569	P43243	MATR3	Succinic anhydride labeling reagent light; Succinic anhydride labeling reagent light	0.105	3.496
Q13509	TUBB3	Propionaldehyde; Deamidation	0.051	1.804	P25325	MPST	Propionaldehyde; Deamidation	0.090	> 20
Q9HBL0	TNS1	Acrolein addition	0.056	319.364	P11586	MTHFD1	Propionaldehyde	0.086	1.683
Q3LXA3	TKFC	Carboxyethyl	0.101	2.053	P35579	MYH9	Acrolein addition; Succinic anhydride labeling reagent light	0.119	2.043
P22314	UBA1	Propionaldehyde	0.141	3.064	Q9NZM1	MYOF	Carboxyethyl	0.101	2.372

O60763	USO1	Half of a disulfide bridge	0.072	3.052	Q92597	NDRG1	Ubiquitin	0.111	2.164
Q15942	ZYX	Acrolein addition; Crotonylation	0.133	6.591	Q15155	NOMO1	Propionaldehyde	0.111	1.875
					P69849	NOMO3	Propionaldehyde	0.076	1.863
					P04181	OAT	Propionaldehyde	0.022	1.363
					O15460	P4HA2	Propionaldehyde	0.123	1.793
					P49585	PCYT1A	Carboxyethyl; Propionaldehyde	0.028	2.604
					P08237	PFKM	Propionaldehyde	0.116	0.916
					P07737	PFN1	Acetylation; Ubiquitin	0.053	> 20
					P18669	PGAM1	Ubiquitin	0.108	240.720
					Q06830	PRDX1	Ubiquitin; Acrolein addition	0.138	9.305
					P62979	RPS27A	Ubiquitin	0.038	2.992
					Q9Y6U3	SCIN	Propionaldehyde	0.090	17.721
					Q8NC51	SERBP1	Carboxyethyl; Deamidation	0.107	1.022
					Q9HAT2	SIAE	Propionaldehyde	0.150	2.428
					Q9HBL0	TNS1	Acrolein addition	0.076	2.446
					Q13509	TUBB3	Propionaldehyde; Deamidation	0.017	6.665
					P22314	UBA1	Propionaldehyde	0.063	3.680
					Q2M389	WASHC4	Propionaldehyde	0.057	> 20
					O75844	ZMPSTE24	Propionaldehyde	0.105	2.014
					Q15942	ZYX	Acrolein addition; Crotonylation	0.049	5.297

4.6 Discussion

Notre étude sur fibroblastes de patients ayant un déficit du métabolisme de la vitamine B₁₂ montre des modifications aux niveaux métabolomiques, transcriptomiques, protéomiques et post-traductionnels des gènes et enzymes impliqués dans des pathologies dont les manifestations sont similaires à celle des IECM. Ces modifications ont un impact sur plusieurs voies métaboliques, dont beaucoup sont impliquées dans le métabolisme énergétique mitochondrial.

Une étude protéomique antérieure sur des fibroblastes de patients *cb1C* a montré des altérations en lien avec le cycle cellulaire, l'expression des gènes, le métabolisme des médicaments, les troubles squelettiques et musculaires et le métabolisme des lipides (385). Une étude protéomique sur des lymphocytes de patients a montré des altérations liées à la détoxification cellulaire, au métabolisme du glutathion (347), au trafic intracellulaire, au repliement des protéines, au métabolisme énergétique et à l'organisation et à l'assemblage du cytosquelette (386). Une autre étude de notre groupe avec des analyses combinées protéomique et transcriptomique a montré des altérations en lien avec le stress cellulaire, les protéines de liaison à l'ARN, responsables d'anomalies d'épissage et d'une perturbation de la navette de l'ARN nucléocytoplasmique (317). Notre étude est la seule à avoir analysé les données multi-omiques (métabolomique, protéomique, transcriptomique et modifications post-traductionnelles) dans les gènes et les protéines associées à des maladies métaboliques rares. Elle a montré l'importance des altérations du métabolisme mitochondrial. Ces altérations se traduisent par une diminution de la respiration mitochondriale et une perturbation du cycle de Krebs.

La plupart des gènes OMIM identifiés ont été régulés à la baisse au niveau transcriptionnel et/ou protéomique. Beaucoup de ces modifications étaient à la baisse et beaucoup de ces voies étaient impliquées dans le métabolisme énergétique mitochondrial.

Nous avons observé une diminution critique de l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme énergétique mitochondrial, tant au niveau transcriptionnel que protéomique dans les C-IECM et Hcy-IECM. Ces résultats suggèrent que la diminution de l'expression de ces gènes est liée à l'altération de l'activité de la MS plutôt qu'à celle de la MUT. La diminution de la synthèse de SAM entraîne des altérations épigénétiques avec des modifications de la méthylation de l'ADN spécifiques à chaque organe. Ces altérations épigénétiques sont liées à la perturbation du transfert

nucléocytoplasmique de l'ARNm dépendant de l'inactivation des complexes PGC-1 α /récepteur nucléaire (35). Au niveau transcriptionnel, les changements les plus pertinents étaient la diminution de l'expression de gènes codés par l'ADN mitochondrial, notamment *MT-TT* (codant pour l'ARNt mitochondrial thréonine), *MT-TP* (codant pour l'ARNt mitochondrial proline) et *MT-CO1* (codant pour la sous-unité 1 de la cytochrome C oxydase du complexe respiratoire IV) et la diminution de l'expression de *OXCT1*, qui code pour la succinyl-CoA:3-oxoacide-CoA transférase. Une expression altérée de ces gènes mitochondriaux est associée à des manifestations neurologiques également observées dans les IECM, notamment un syndrome extrapyramidal, une hypotonie, des crises d'épilepsie, un retard de développement, une cardiomyopathie et des manifestations ophtalmologiques. La succinyl-CoA:3-oxoacide-CoA transférase catalyse le transfert réversible de CoA du succinyl-CoA à l'acétoacétate comme première étape de l'utilisation des corps cétoniques. Le déficit en *OXCT1* pourrait contribuer aux manifestations neurologiques des IECM en diminuant la production de corps cétoniques nécessaires pour alimenter les besoins énergétiques du cerveau. Les besoins énergétiques du cerveau en corps cétoniques sont par ailleurs fondamentaux dans le vieillissement cérébral. L'énergie fournie par le glucose au cerveau est altérée en cas de troubles cognitifs modérés ou de maladie d'Alzheimer. Cependant, il est observé une certaine amélioration des résultats cognitifs en cas de régimes céto-gènes dans ces deux pathologies (228, 229, 449-451).

Au niveau protéomique, les modifications observées les plus pertinentes dans les C-IECM et/ou les Hcy-IECM étaient liées aux voies mitochondriales et aux enzymes impliquées dans d'autres troubles héréditaires du métabolisme, comme la sous-unité A8 de la NADH:ubiquinone oxydoréductase (NDUFA8), la carnitine palmitoyltransférase 2 (*CPT2*) et la sous-unité X de l'ubiquinol-cytochrome c réductase, complexe III (*UQCR10*). Des variants pathogènes de ces gènes sont associés à des maladies mitochondriales graves. Il convient de noter qu'un déficit en NDUFA8 est associé à une cardiomyopathie, de l'hypertension pulmonaire, un retard de développement, une hypotonie et une atrophie cérébrale. Ces signes cliniques sont également rapportés dans les déficits de type *cb1C* et *cb1G/E*. La diminution de l'expression de NDUFA8 pourrait participer à la survenue de l'hypertension pulmonaire, dont la pathogénicité est mal connue. *CPT2* joue un rôle maître dans l'entrée des acyl-CoA dans la mitochondrie, et les mutations pathogènes de *CPT2* sont

responsable de l'apparition d'une cardiomyopathie, d'une hypotonie et de crises d'épilepsie, qui ont également été rapportées dans les déficits *cb1C* et *cb1G*. UQCR10 est une sous-unité du complexe III mitochondrial, élément important de la chaîne respiratoire au niveau de la membrane mitochondriale interne (452). Il n'y a actuellement aucune pathologie décrite en cas de mutations de ce gène. Cependant, étant donné son rôle crucial au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale, on peut s'attendre à ce qu'un niveau d'expression diminué puisse produire des manifestations neurologiques.

Il convient de noter que parmi les 6 PTM les plus importantes sur les enzymes dans les fibroblastes des patients *cb1C*, 5 (83 %) étaient dues à l'ajout de propionaldéhyde. Cette PTM est cohérente avec une concentration accrue de propionate et de méthylglyoxalate dans les fibroblastes *cb1C*, car ces deux molécules sont des précurseurs métaboliques du propionaldéhyde (**Figure 44**). La concentration accrue de méthylglyoxalate pourrait être liée à une altération de la glycolyse, comme le montre la concentration de pyruvate à la limite supérieure de la normale (**Figures 43-44**). Les additions de propionaldéhyde ont été observées dans une moindre mesure dans les fibroblastes *cb1G*. L'OAT était la seule enzyme présentant une addition de propionaldéhyde dans les fibroblastes de patients *cb1C* et *cb1G*, mais l'addition de groupement propionaldéhyde était plus élevée dans les fibroblastes *cb1C* que dans les fibroblastes *cb1G*. Il s'agit d'une enzyme de la matrice mitochondriale qui catalyse la transamination de l'ornithine en glutamate semialdéhyde. Il s'agit d'un dimère. Nous avons observé l'addition d'un propionaldéhyde sur le résidu histidine 53. L'histidine 53 est située dans la première boucle de la sous-unité A entre une alanine en position 52 et une asparagine en position 54, et qui interagit avec l'arginine 113 de la sous-unité B. La première boucle de la sous-unité A joue un rôle important dans la stabilité du dimère et une PTM sur cette position pourrait perturber la dimérisation, avec des conséquences dramatiques sur l'activité catalytique (**Figure 49**). Le déficit en OAT peut se révéler au cours la période néonatale par une encéphalopathie avec une hyperammoniémie, une diminution de l'ornithine plasmatique et une augmentation de la glutamine plasmatique. Ces trois résultats métaboliques sont également observés dans les déficits *cb1C* (**Figure 42**). Les taux plasmatiques d'ammoniac se normalisent plus tard dans la vie. La principale expression clinique est une rétinopathie d'aspect très particulier et, chez certains patients, un retard mental modéré. La spectrine codée par *SPTAN1* est une autre protéine présentant une addition de propionaldéhyde dans

les fibroblastes *cb/C*. Son déficit génétique peut produire des signes cliniques similaires à ceux rapportés dans le déficit de type *cb/C*, notamment une microcéphalie, des crises d'épilepsie, une hypotonie et une atrophie cérébrale. Les spectrines sont des protéines du cytosquelette qui organisent les organelles intracellulaires et sont impliquées dans la réparation de l'ADN et la régulation du cycle cellulaire.

Le résultat le plus significatif de l'étude métabolomique du cycle de Krebs est l'augmentation de l' α -cétoglutarate dans les fibroblastes *cb/G* et *cb/C*. L'augmentation du α -cétoglutarate et la diminution de l'isocitrate pourraient indiquer une perturbation de la principale voie anaplérotique de synthèse du citrate compensée par l'augmentation de la voie anaplérotique glutamine/ α -cétoglutarate. Cette hypothèse doit être confirmée par d'autres études du flux métabolique. L'augmentation de α -cétoglutarate était plus importante dans les fibroblastes *cb/G* que dans les fibroblastes *cb/C*, ce qui suggère qu'elle pourrait être une conséquence d'une altération de l'activité de la MS. Cependant, cette augmentation pourrait résulter d'une diminution de l'activité des deux enzymes cibles de la cobalamine. En effet, une récente étude multi-omique vient de montrer qu'il existe une augmentation similaire de α -cétoglutarate liée à une augmentation de la voie anaplérotique glutamine/ α -cétoglutarate dans des fibroblastes de patients MMUT (453).

L'activité des sirtuines est diminuée dans les fibroblastes *cb/G* (35). Les PTM liées à une acylation accrue des protéines dans les cellules *cb/C* et *épi-cb/C* suggèrent que le déficit combiné en MS et MUT pourrait avoir des effets synergiques. En effet l'effet de la diminution d'activité des sirtuines est responsable d'une diminution de la désacétylation qui s'associe à l'augmentation de l'acylation par une production accrue d'acides organiques, comme le résume la **Figure 50**. Cette hypothèse est cohérente avec les résultats d'une étude très récente qui a montré une malonylation accrue altérant l'activité d'enzymes clés du cycle de l'urée et de la voie de clivage de la glycine dans le foie de patients ayant un déficit de type MMA-IECM (393). Ces altérations PTM et métaboliques ont été réversées par une Sirt5 modifiée, dans des souris mutantes MMA-IECM. L'expression modifiée de Sirt5 par thérapie génique a diminué l'ammonémie et réduit la méthylmalonylation globale dans le modèle animal. En outre, l'accumulation d'acides organiques est responsable d'altérations de l'ultra-structure mitochondriale dans différents organes (cerveau, foie, reins et cœur) par le biais d'une mitophagie médiée par PINK1/Parkin dans le modèle MMA-IECM (349, 350, 431, 454, 455).

Plusieurs limites de notre étude méritent d'être discutées. Nous n'avons pas évalué les altérations multi-omiques observées sur les gènes du métabolisme énergétique mitochondrial par western blot et/ou RT-qPCR. Cependant, nous avons utilisé une technique d'RNA-seq qui produit des résultats étroitement corrélés à la RT-qPCR (456). La quantification de l'expression des protéines par spectrométrie de masse est plus précise que celle par western blot. En outre, nous avons confirmé les conséquences phénotypiques globales des altérations multi-omiques du métabolisme énergétique mitochondrial en montrant une diminution spectaculaire de la respiration basale et de la respiration mitochondriale maximale (**Figure 44B**). Une deuxième limite potentielle de notre étude a été d'effectuer les analyses multi-omiques sur des fibroblastes sans tenir compte des spécificités métaboliques des principaux organes affectés par les IECM. Nous avons partiellement remédié à cette limitation en confirmant le principal résultat de nos analyses métabolomiques, l'augmentation de α -cétoglutarate dans des cellules iPSC différenciées en cardiomyocytes et dans l'hippocampe de souris MTR KO, avec la même différence entre *cb1G* et *cb1C* que celle observée dans les fibroblastes (**Figure 41 et 44A**).

En conclusion, nos résultats montrent que les conséquences métaboliques, génomiques, épigénomiques et post-traductionnelles observées dans les fibroblastes de patients peuvent expliquer une partie des manifestations métaboliques et cliniques rapportées dans les déficits du métabolisme de la vitamine B₁₂. De nombreuses altérations au niveau transcriptomique et protéomique concernent des gènes impliqués dans d'autres maladies rares, avec des manifestations cliniques communes aux IECM. Ceci pourrait contribuer à la grande variabilité des manifestations observés. Nos résultats sur les PTM suggèrent une synergie de mécanismes résultant d'une part de l'augmentation de l'acylation des protéines par l'accumulation de métabolites dérivés du cycle de Krebs et d'autre part de la diminution de la désacétylation des protéines par diminution d'expression des sirtuines. Toutes ces modifications contribuent à mieux comprendre pourquoi certaines manifestations sont spécifiques à la période néonatale et d'autres à l'âge adulte.

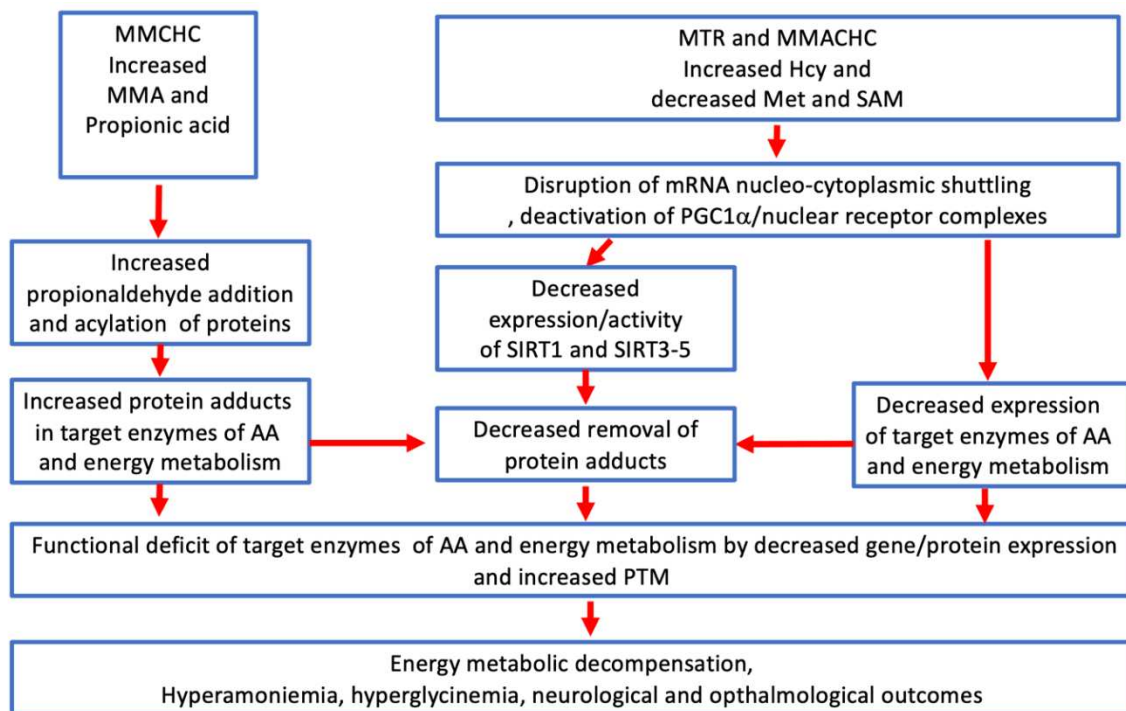


Figure 50. Résumé des conséquences génomiques, protéomiques et post-traductionnelles des troubles héréditaires du métabolisme des cobalamines de type *cb1C*. Les déficits combinés des activités MUT et MS produisent des effets synergiques avec des conséquences liées à l'altération de l'expression et de la fonction des protéines qui peuvent contribuer au phénotype clinique et métabolique. Le déficit en MUT augmente la concentration de MMA et la méthylmalonylation des protéines. Le déficit en MS entraîne une augmentation de la concentration de Hcy et une diminution de la SAM responsable d'un stress du réticulum endoplasmique (RE) et d'altérations épigénomiques, protéomiques et métabolomiques. Ceci est la conséquence de la désactivation des complexes PGC1/récepteur nucléaire, la perturbation de la circulation nucléo-cytoplasmique de l'ARNm (dépendant de HuR) et la diminution de l'activité des sirtuines. L'altération de l'activité des sirtuines augmente les modifications post-traductionnelles (PTM) des protéines en diminuant l'élimination des additions de groupement acétyle, propionyle, succinyle, glutaryle, malonyle et méthylmalonyle sur des résidus lysine des enzymes cibles. De manière synergique, le déficit en MUT augmente la production d'acide propionique et d'acide méthylmalonique et d'autres acides organiques qui peuvent provoquer une hyperacylation au niveau de résidus lysine des protéines impliquées dans les complexes de la chaîne respiratoire, la bêta-oxydation, le cycle de l'urée, le cycle de Krebs et la décarboxylation de la glycine dans des organes tel que le foie et le cœur.

5 Discussion générale

Le métabolisme de la vitamine B₁₂ est un processus complexe, nécessitant l'intégrité de nombreuses molécules et enzymes, pour permettre à l'organisme d'aboutir à la synthèse des deux formes actives de la vitamine B₁₂ : l'AdoCbl, cofacteur de la Méthylmalonyl-CoA-Mutase, importante dans le métabolisme énergétique par la synthèse de succinyl-CoA et sa fonction anaplérotique pour le cycle de Krebs, et la MeCbl, cofacteur de la Méthionine Synthase, indispensable au bon fonctionnement du cycle de la méthionine et la synthèse de SAM, permettant de nombreuses réactions de méthylation dans l'organisme. Les désordres du métabolisme intracellulaire de la vitamine B₁₂ sont des pathologies difficiles à appréhender, loin du modèle simple d'une pathologie autosomique récessive responsable d'un signe clinique ou d'une anomalie biochimique pathognomonique. Les pathologies sur cette voie métabolique sont responsables d'une grande hétérogénéité de manifestations cliniques qui diffèrent selon l'âge d'apparition des symptômes et le gène muté, laissant sous tendre des mécanismes physiopathologiques complexes, impliquant de nombreuses modifications à l'échelle génomique et post-génomique.

Dans la première étude, nous avons réalisé la première méta-analyse sur données individuelles dans le champ du métabolisme de la vitamine B₁₂ avec la description de 824 patients ayant un déficit génétiquement documenté. Cette analyse des manifestations cliniques montre que les patients de plus de 15 ans ont une présentation clinique distincte et présentent des variants génétiques moins sévères que les nouveau-nés et les enfants. Certaines manifestations prédominent également selon le groupe de gènes fonctionnels. Ceci pourrait refléter des mécanismes physiopathologiques spécifiques liés à une altération soit de la synthèse de la méthionine soit du catabolisme du méthylmalonyl-CoA. Des manifestations neurologiques (troubles de la marche, neuropathie périphérique ou syndrome pyramidal) ont été observées chez près d'un tiers des patients de plus de 15 ans. Ces manifestations sont probablement liées à l'altération de la synthèse endogène de méthionine, puisqu'elles ont été principalement observées chez les patients des clusters de gènes « Reméthylation » et « Transport cytoplasmique ». Ces résultats sont cohérents avec des études expérimentales sur des modèles cellulaires, des fibroblastes de patients et des modèles animaux, dans lesquelles le déficit cellulaire en cobalamine modifie le transport nucléo-cytoplasmique, l'épissage d'ARNm et

augmente le stress du RE, via une diminution de l'expression de SIRT1 et du déséquilibre phosphorylation/méthylation des protéines de liaison à l'ARN, notamment ELAV1. Les manifestations cardiovasculaires telles que les événements thromboemboliques, la cardiomyopathie et l'hypertension artérielle sont principalement observées chez les plus de 15 ans. Elles étaient probablement sous-estimées dans les revues et registres précédents, qui évaluaient surtout les cas rapportés en pédiatrie. Elles pourraient être liées à l'augmentation de l'homocystéine. L'association de l'augmentation de la pression artérielle systolique avec l'âge est une manifestation jusqu'ici non reconnue dans ce groupe de maladies. Ces maladies rares peuvent être sous-estimées, voire ignorées, dans la pratique habituelle des cardiologues, neurologues et des internistes qui prennent en charge ses patients. Les profils cliniques neurologiques et cardiovasculaires pourraient inciter les cliniciens à vérifier systématiquement les marqueurs métaboliques du statut en vitamine B₁₂, notamment l'homocystéine et l'acide méthylmalonique, lorsque les étiologies habituelles sont écartées. Les analyses génétiques pourraient être intégrées dans le bilan diagnostique de ces patients.

Notre deuxième étude s'est justement intéressée à une approche basée sur le séquençage de l'exome clinique (CES) comme stratégie diagnostique de premier niveau chez les patients pour lesquels un diagnostic de troubles héréditaires du métabolisme est suspecté. Nous rapportons un rendement diagnostique du CES de 55% sur 128 patients pédiatriques consécutifs d'un centre de référence, explorés par CES comme test génétique de premier niveau pour suspicion de maladie génétique. De façon intéressante, le rendement était différent selon le sous-groupe exploré. Seulement 28 % des CES étaient positifs en cas d'absence d'éléments biologiques évocateurs et atteignait 60 % chez les enfants atteints d'anomalies biochimiques orientant fortement vers une IEM, comme les IECM. Le délai médian entre le prélèvement et le rapport était de 5 mois, rappelant l'importance d'un échange efficace entre pédiatre et médecin de médecine moléculaire. Notre étude montre donc tout l'intérêt du CES comme approche diagnostique lors d'une suspicion d'IECM. L'identification d'une erreur génétique du métabolisme de la vitamine B₁₂ pourrait permettre une approche thérapeutique personnalisée permettant une restauration partielle ou totale des altérations métaboliques avec des bénéfices potentiels à long terme.

Notre troisième étude s'intéressait aux modifications dans des fibroblastes de patients, de l'expression aux niveaux métabolomique, transcriptomique, protéomique et aux modifications post-transcriptomiques des gènes qui codent pour des enzymes impliquées dans des pathologies dont les manifestations présentent des similitudes avec les IECM. Nous avons observé une diminution de l'expression des gènes critiques du métabolisme énergétique mitochondrial au niveau transcriptionnel et protéique dans les C-IECM et Hcy-IECM. Au niveau transcriptionnel, les changements les plus pertinents comprenaient la diminution de l'expression des gènes codés par l'ADN mitochondrial, notamment *MT-TT*, *MT-TP* et *MT-CO1*. L'expression altérée des gènes mitochondriaux entraîne des manifestations neurologiques qui sont également observées dans les IECM. Au niveau protéomique, les modifications les plus pertinentes étaient liées aux voies mitochondriales comme la sous-unité A8 de la NADH:ubiquinone oxydoréductase (*NDUFA8*), la carnitine palmitoyltransférase 2 (*CPT2*) et la sous-unité X de l'ubiquinol-cytochrome c réductase, complexe III (*UQCR10*). Ces différentes protéines étant toutes associées à des manifestations cliniques observées dans le cadre des IECM. Enfin, les modifications post-transcriptionnelles ont mis en évidence l'existence de groupements propionaldéhyde secondaires à une concentration accrue de propionate et de méthylglyoxalate dans les fibroblastes du patient *cb/C*. Cette hypothèse fait écho à l'observation d'une malonylation accrue dans le foie de patient ayant un déficit de type MMA-IECM, altérant le fonctionnement d'enzymes clés du cycle de l'urée et de la voie de clivage de la glycine. Ces additions post-traductionnelles pourraient être responsable d'une altération de fonctionnement d'enzymes impliquées dans d'autres voies métaboliques, responsable de manifestations cliniques également observés dans ces pathologies (atteintes neurologiques, hypertension artérielle pulmonaire, etc.)

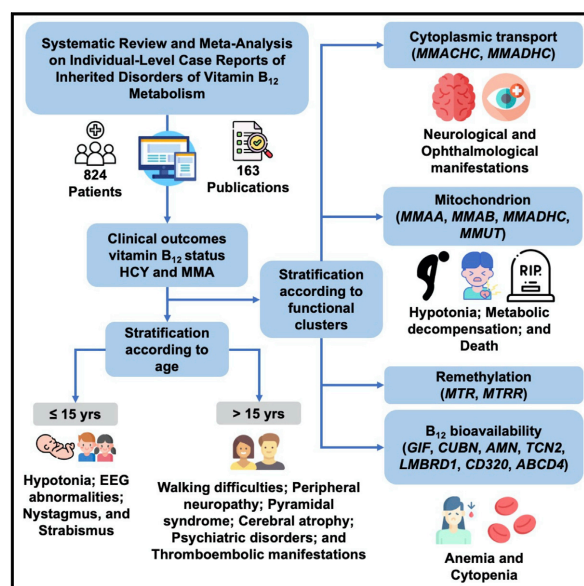
En conclusion, nos résultats montrent que les conséquences métaboliques, génomiques, épigénomiques et translationnelles observées dans les fibroblastes des patients peuvent expliquer une partie de la variabilité clinique et métabolique dans les déficits du métabolisme de la vitamine B₁₂. Ces différentes altérations contribuent à mieux comprendre pourquoi certaines manifestations sont spécifiques à la période néonatale et d'autres à l'âge adulte.

6 Articles publiés

6.1 Etude n1 – Méta-Analyse – Cell Report Medicine (IF 16.988)

Clinical, phenotypic and genetic landscape of case reports with genetically proven inherited disorders of vitamin B₁₂ metabolism: A meta-analysis

Graphical abstract



Authors

Arnaud Wiedemann,
Abderrahim Oussalah,
Nathalie Lamireau, ...,
Marine Frayssinoux, François Feillet,
Jean-Louis Guéant

Correspondence

jean-louis.gueant@univ-lorraine.fr

In brief

This systematic review by Wiedemann et al. highlights age categories and gene clusters as major determinants of patients' phenotypic landscape in inherited disorders of vitamin B₁₂ metabolism. The diagnosis and management of these disorders must be considered in adult patients who present with neurological and thromboembolic manifestations of unknown origin.

Highlights

- We analyze 824 individual case reports with genetically proven vitamin B₁₂ disorders
- “Cytoplasmic transport” gene cluster is associated with neurological manifestations
- “B₁₂ availability” and “remethylation” gene clusters are associated with anemia
- Neurological and thromboembolic manifestations are frequent in adult patients



Wiedemann et al., 2022, Cell Reports Medicine 3, 100670
July 19, 2022 © 2022 The Author(s).
<https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2022.100670>

Article

Clinical, phenotypic and genetic landscape of case reports with genetically proven inherited disorders of vitamin B₁₂ metabolism: A meta-analysis

Arnaud Wiedemann,^{1,2,3} Abderrahim Oussalah,^{1,3,4,5} Nathalie Lamireau,² Maurane Théron,² Melissa Julien,⁴ Jean-Philippe Mergnac,² Baptiste Augay,² Pauline Deniaud,² Tom Alix,⁴ Marine Frayssinoux,⁴ François Feillet,^{1,2,3} and Jean-Louis Guéant^{1,3,4,5,6,*}

¹Nutrition, Genetics, and Environmental Risk Exposure (NGERE), Faculty of Medicine of Nancy, University of Lorraine, INSERM UMR_S 1256, 54000 Nancy, France

²Department of Pediatrics, University Hospital of Nancy, 54000 Nancy, France

³Reference Center for Inborn Errors of Metabolism (ORPHA67872), University Hospital of Nancy, 54000 Nancy, France

⁴Department of Molecular Medicine, Division of Biochemistry, Molecular Biology, Nutrition, and Metabolism, University Hospital of Nancy, 54000 Nancy, France

⁵These authors contributed equally

⁶Lead contact

*Correspondence: jean-louis.gueant@univ-lorraine.fr

<https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2022.100670>

SUMMARY

Inherited disorders of B₁₂ metabolism produce a broad spectrum of manifestations, with limited knowledge of the influence of age and the function of related genes. We report a meta-analysis on 824 patients with a genetically proven diagnosis of an inherited disorder of vitamin B₁₂ metabolism. Gene clusters and age categories are associated with patients' manifestations. The "cytoplasmic transport" cluster is associated with neurological and ophthalmological manifestations, the "mitochondrion" cluster with hypotonia, acute metabolic decompensation, and death, and the "B₁₂ availability" and "remethylation" clusters with anemia and cytopenia. Hypotonia, EEG abnormalities, nystagmus, and strabismus are predominant in the younger patients, while neurological manifestations, such as walking difficulties, peripheral neuropathy, pyramidal syndrome, cerebral atrophy, psychiatric disorders, and thromboembolic manifestations, are predominant in the older patients. These results should prompt systematic checking of markers of vitamin B₁₂ status, including homocysteine and methylmalonic acid, when usual causes of these manifestations are discarded in adult patients.

INTRODUCTION

Vitamin B₁₂, also known as cobalamin, is a water-soluble vitamin that influences key biochemical functions involved in DNA synthesis, methylation of DNA, proteins and metabolites, and mitochondrial metabolism through its role as a precursor of methylcobalamin and adenosylcobalamin, which act as cofactors for two target enzymes, cytoplasmic methionine synthase and mitochondrial methylmalonyl-CoA mutase, respectively.^{164–166} Vitamin B₁₂ is not produced in humans and must be provided by foods of animal origin.¹⁶⁷ The absorption and metabolism of vitamin B₁₂ is a complex multistep process reviewed in Green et al.¹⁶⁴ Following ingestion, B₁₂ is liberated from food carrier proteins and binds to haptocorrin in the stomach and transferred to gastric intrinsic factor (GIF) when haptocorrin is degraded in the small bowel. The GIF-B₁₂ complex is absorbed in the distal ileum through a receptor composed of amnionless (encoded by *AMN* gene) and cubilin (encoded by *CUBN* gene). In blood, B₁₂ is transported by haptocorrin and transcoba-

lin. The circulating B₁₂ bound to transcobalamin is available for cellular uptake in most tissues via TcblR/CD320 receptor-mediated endocytosis. B₁₂ lysosomal degradation of transcobalamin releases B₁₂, and the vitamin is subsequently exported into the cytosol by LMBD1 and ABCD4. In the cytosol, MMACHC and MMADHC chaperone and orientate B₁₂ toward the synthesis of the MeCbl and AdoCbl cofactors in the cytosol and mitochondrion, respectively. At the cytosolic level, methylcobalamin is required for the remethylation of homocysteine into methionine by methionine synthase. This remethylation pathway involves adding a methyl group provided by methyltetrahydrofolate.^{164,168} Methionine is the immediate metabolic precursor of S-adenosylmethionine, which is the universal methyl-donor in the transmethylation of DNA, histones, and other proteins and small molecules in mammals.^{164,167–169} At the mitochondrial level, adenosylcobalamin serves as a cofactor of methylmalonyl-CoA mutase to catalyze the conversion of L-methylmalonyl-CoA to succinyl-CoA, which represents the final step of the anaplerotic replenishment of the tricarboxylic



Cell Reports Medicine 3, 100670, July 19, 2022 © 2022 The Author(s). 1
This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

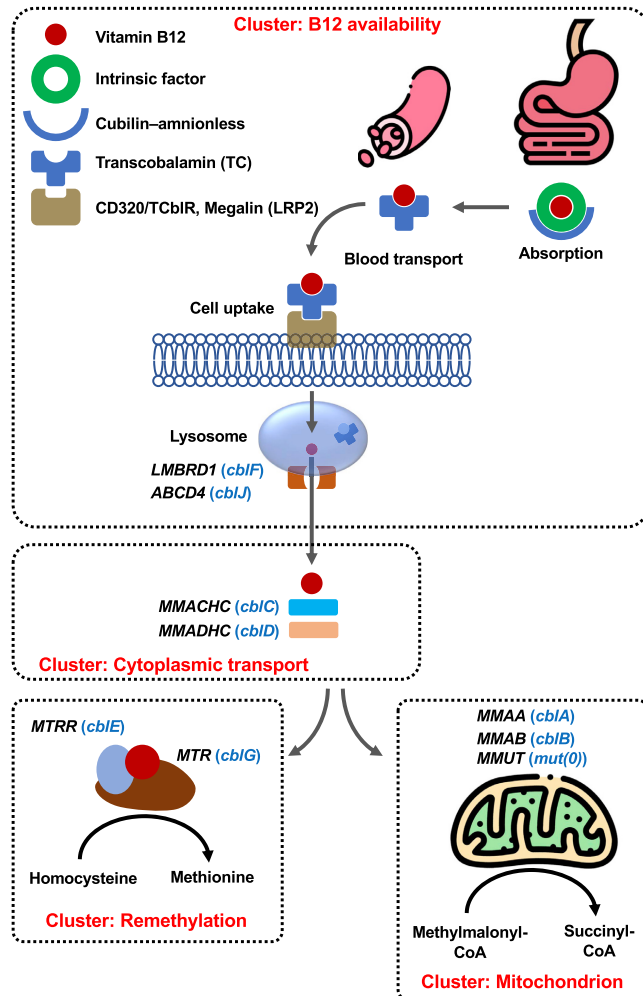


Figure 1. The four clusters are defined according to the function and metabolic consequences of genes involved in inherited disorders of vitamin B₁₂ metabolism

The cluster “B₁₂ bioavailability” includes gene defects involved in B₁₂ absorption, blood transport, and cellular uptake, with an expected abnormal level of blood vitamin B₁₂ and/or transport proteins and a combined increase of homocysteine and methylmalonic acid. Note that gene defects in lysosome export may also produce vitamin B₁₂ deficit through impaired vitamin B₁₂ absorption. The “cytoplasmic transport” cluster includes gene defects of cytoplasmic transport with an expected normal blood level of vitamin B₁₂ and/or transport proteins and a combined increase of homocysteine and methylmalonic acid. The “remethylation” cluster includes gene defects of the remethylation pathway of homocysteine with an expected normal blood level of vitamin B₁₂ and/or transport proteins and methylmalonic acid and an increased level of homocysteine. The “mitochondrion” cluster of the B₁₂ mitochondrion pathway includes gene defects involved in the mitochondrion processing of B₁₂ and conversion of L-methylmalonyl-CoA to succinyl-CoA. The complementation groups corresponding to vitamin B₁₂ metabolism defects are indicated in blue font (icons made by flaticon, flaticon.com; CC-BY-3.0).

of clinical manifestations, biological, electrophysiological, and imaging findings among patients with inherited disorders of vitamin B₁₂ metabolism. In particular, no systematic assessment, comparison, and categorization of all disorders have been performed to describe their clinical and metabolic spectrum in relation to age and functional type of gene defects. To address this issue, we defined four functional gene clusters according to the function and metabolic consequences of genes involved in inherited disorders of vitamin B₁₂ metabolism, namely “B₁₂ bioavailability,” “cytoplasmic transport,” “remethylation,” and “mitochondrion” clusters (Figure 1). Thus, we conducted a systematic review of the literature using a highly sensitive search strategy to identify case reports describing individual-level

acid cycle by the catabolism of branched-chain amino acids, odd-chain fatty acids, and side chain of cholesterol.¹⁷⁰ The critical metabolic role of B₁₂ is illustrated by the broad spectrum of clinical manifestations of inherited disorders of vitamin B₁₂ metabolism. Inherited disorders of vitamin B₁₂ metabolism are caused by a wide variety of genetic alterations in the genes involved in the absorption, cell trafficking, and intracellular metabolism of vitamin B₁₂.

To date, there is insufficient knowledge regarding the evaluation of the prevalence and classification of the broad spectra

data of patients with a genetically proven diagnosis of an inherited disorder of vitamin B₁₂ metabolism. We performed a meta-analysis to assess the clinical, biological, imaging, and electrophysiological manifestations in the studied population and according to three age categories, <1 year, 1–15 years, and >15 years. We performed phenotype-wide association studies to assess the predictors associated with age categories, functional gene clusters, and death. We highlighted specific manifestations according to age and gene clusters, which will help better understand the pathomechanisms that underlie the

two impaired B₁₂-dependent metabolic pathways and better orientate the diagnosis and management of this complex group of inherited metabolic disorders.

RESULTS

Literature review

As reported in the PRISMA flow diagram (Figure S1, related to Table 1), the systematic search generated 12,614 citations, of which 678 appeared to be relevant to the systematic review. Of these 678 publications, 515 were excluded based on selection criteria, including 156 studies that lacked a molecular diagnosis (Table S1, related to Table 1). One-hundred and sixty-three publications were eligible for the systematic review and reported individual-level case reports on 824 patients with a genetically proven inherited disorder of vitamin B₁₂ metabolism.^{1–163}

Description of the whole population of the 824 patients with inherited disorders of vitamin B₁₂ metabolism

Among the 824 patients included in the systematic review, the proportion of males was 53% and the median age was 3.7 years (IQR, 0.2–2.0; range, 0–59.0) (Table 1). Seventy-one percent of patients were under 1 year old and 10.3% were over 15 years old. *MMACHC* gene pathogenic variants were the most frequently reported (49.6%, 409/824), followed by *MMUT* (32.6%, 269/824), *MMAA* (6.1%, 50/824), and *MMAB* (3.5%, 29/824) (Table 1). The annotation of the genetic variants retrieved in each of these four genes, including the HGVS nomenclature to report DNA and protein sequences variants and pathogenicity prediction according to the ACMG classification, is reported in Tables S2–S5 (related to Tables 1–4). Neurological manifestations were the most frequently reported and included developmental delay (38.2%, 315/824), hypotonia (17.7%, 146/824), and seizures (10.6%, 87/824). Digestive manifestations were the second most observed category of manifestations and corresponded to feeding intolerance (24.9% 205/824). Acute metabolic decompensation was reported in 13.2% of cases (109/824) and death occurred in 13.1% (108/824).

Phenotypic landscape and predictors of inherited disorders of vitamin B₁₂ metabolism according to age category

The number of patients who were less than 1 year old was 509 (71.1% of the whole population). Among them, pathogenic variants on *MMACHC* and *MMUT* were observed in 44.4% (226/509) and 37.7% (192/509) of cases, respectively. In this age subgroup, neurological manifestations were the most frequently reported and included developmental delay (40.5%, 206/509), hypotonia (21.0%, 107/509), and seizures (9.4%, 48/509). Feeding intolerance was reported in 30.6% (156/509) of patients, and 17.1% (87/509) died (Table 2). The number of patients between 1 and 14 years was 133 (median 4.0 years; IQR, 2.0–9.0). In this age category, *MMACHC* deficiency was observed in 57.1% (76/133) and *MMUT* deficiency in 20.3% (27/133). Neurological manifestations were the most frequently reported and included developmental delay (39.1%, 52/133) and peripheral neuropathy (15.8%, 21/133). Cardiovascular manifestations frequently reported were high blood pressure,

pulmonary hypertension (8.3%, 11/133), and cardiomyopathy (5.3%, 7/133). The number of patients over 15 years was 74 (median age 20.0; IQR, 18.0–29.0). In this age category, *MMACHC* deficiency was observed in 91.9% of cases (68/74). Neurological manifestations were the most frequently reported in this age category and included walking difficulties 37.8% (28/74), development delay 32.4% (24/74), and peripheral neuropathy 29.7% (22/74). Psychiatric disorders and high blood pressure were reported in 33.8% (25/74) and 12.2% (9/74), respectively.

We evaluated the influence of gradually increasing patient age categories on observed clinical manifestations (Figure 2). We observed a very significant increase in the frequency of neurological manifestations in relation to age categories. This mainly concerned the difficulty in walking and the presence of peripheral neuropathy, pyramidal syndrome, and, to a lesser extent, extrapyramidal syndrome. Likewise, we observed a significant influence of age on the frequency of cerebral atrophy and electroencephalogram abnormalities as well as for psychiatric manifestations. Unlike the neurological and psychiatric manifestations, the ophthalmological manifestations, nystagmus, and strabismus were mainly diagnosed in the first year of life and inversely correlated with age. The frequency of cardiovascular manifestations, including thrombosis and blood pressure, also increased very significantly with age. The increase in systolic blood pressure was not related to renal failure, as the latter was not significantly associated with age (Figure 2).

Phenotypic landscape and predictors of inherited disorders of vitamin B₁₂ metabolism according to functional gene clusters

Cytoplasmic transport gene cluster

We classified 416 patients in the cytoplasmic transport gene cluster. The median age was 0.3 years (IQR, 0–10.3) (Table 3). A total of 61.5% (232/377) of the patients were less than 1 year old, 20.4% (77/377) were 1 to 14 years old, and 18.0% (68/377) were 15 years old or more. Among the most frequent neurological manifestations were developmental delay (35.3%, 147/416), hypotonia (15.4%, 64/416), and seizures (14.2%, 59/416). Ophthalmological manifestations were often reported, including nystagmus (16.8%, 70/416) and maculopathy or retinopathy (15.1%, 63/416). Psychiatric disorders occurred in 11.8% of cases (49/416), cardiomyopathy in 5.1% (21/416), and hypertension in 4.6% (19/416). Seventy variants of the *MMACHC* gene were reported (Table S2, related to Tables 1–4). The most frequently reported variants were c.270_271insA (274 occurrences; most frequently observed in the age subgroup 0 to 1 year: 76%, 208/274), c.609G > A (98 occurrences), and c.482G > A (82 occurrences; most frequently observed in the age subgroup 15 years and more: 46%, 38/82). In logistic regression analysis with Bonferroni correction, the following items were significantly associated with an increased risk of belonging to the cytoplasmic transport functional gene cluster when compared with the remaining functional gene clusters, in the descending order of ORs: nystagmus (OR, 27.24; 95% CI: 8.50–87.30); maculopathy or retinopathy (OR, 17.98; 95% CI: 6.48–49.90); psychiatric disorders (OR, 17.98; 95% CI: 5.56–58.18); over 15 years age category (OR, 12.18;



Table 1. Clinical, biological, imaging, and electrophysiological findings of the 824 patients included in the individual patient-level meta-analysis

Demographic data		
Age (years) – n, median (IQR; range)	716	3.7 (0.2–2; 0–59)
Age, 0 to 1 year – n/N, % (95% CI)	509/716	71.1 (67.8–74.4)
Age, 1 to 14 years included – n/N, % (95% CI)	133/716	18.6 (15.7–21.4)
Age, 15 years and more – n/N, % (95% CI)	74/716	10.3 (8.1–12.6)
Male gender – n/N, % (95% CI)	328/620	52.9 (49.0–56.8)
Gene – n/N, % (95% CI)		
MMACHC	409/824	49.6 (46.2–53.1)
MMUT	269/824	32.6 (29.4–35.9)
MMAA	50/824	6.1 (4.4–7.7)
MMAB	29/824	3.5 (2.3–4.8)
MTRR	16/824	2.0 (1.0–2.9)
MMADHC	15/824	1.8 (0.9–2.7)
TCN2	13/824	1.6 (0.7–2.4)
AMN	6/824	0.7 (0.1–1.3)
ABCD4	4/824	0.5 (0.0–0.9)
CBLIF (alias, G/F)	3/824	0.4 (0.0–0.8)
LMRD1	3/824	0.4 (0.0–0.8)
MTR	3/824	0.4 (0.0–0.8)
CUBN	2/824	0.2 (0.0–0.6)
CD320	1/824	0.1 (0.0–0.4)
ZF143	1/824	0.1 (0.0–0.4)
Gene clusters ^a – n/N, % (95% CI)		
Cytoplasmic transport ^b	416/823	50.5 (47.1–54.0)
Mitochondrion ^c	353/823	42.9 (39.5–46.3)
B ₁₂ bioavailability ^e	32/823	3.9 (2.6–5.2)
Remethylation ^d	22/823	2.7 (1.6–3.8)
Clinical findings		
Neurological manifestations – n/N, % (95% CI)		
Developmental delay	315/824	38.2 (34.9–41.6)
Hypotony	146/824	17.7 (15.1–20.3)
Seizures	87/824	10.6 (8.5–12.6)
Walking difficulty	66/824	8.0 (6.2–9.9)
Peripheral neuropathy	64/824	7.8 (5.9–9.6)
Pyramidal syndrome	36/824	4.4 (3.0–5.8)
Extrapyramidal syndrome	30/824	3.6 (2.4–4.9)
Microcephaly	24/824	2.9 (1.8–4.1)
Digestive manifestations – n/N, % (95% CI)		
Feeding intolerance	205/824	24.9 (21.9–27.8)
Multiple organ failure – n/N, % (95% CI)		
Acute metabolic decompensation	109/824	13.2 (10.9–15.5)
Death	108/824	13.1 (10.8–15.4)
Ophthalmologic manifestations – n/N, % (95% CI)		
Nystagmus	74/824	9.0 (7.0–10.9)
Maculopathy or retinopathy	67/824	8.1 (6.3–10.0)
Strabismus	26/824	3.2 (2.1–4.4)
Renal manifestations – n/N, % (95% CI)		
Chronic kidney disease	58/824	7.0 (5.3–8.8)

(Continued on next page)



Table 1. Continued

Acute kidney failure or hemolytic-uremic syndrome	37/824	4.5 (3.1–5.9)
Psychiatric manifestations – n/N, % (95% CI)		
Psychiatric disorders	52/824	6.3 (4.7–8.0)
Behavior abnormality	24/824	2.9 (1.8–4.1)
Cardiovascular manifestations – n/N, % (95% CI)		
Cardiomyopathy	27/824	3.3 (2.1–4.5)
High blood pressure	21/824	2.6 (1.5–3.6)
Pulmonary hypertension	16/824	1.9 (1.0–2.9)
Thrombosis	13/824	1.6 (0.7–2.4)
Miscellaneous manifestations – n/N, % (95% CI)		
Intrauterine growth restriction	15/824	1.8 (0.9–2.7)
Dermatologic abnormality	7/824	0.8 (0.2–1.5)
Gout	5/824	0.6 (0.0–1.1)
Pregnancy	4/824	0.5 (0.0–1.0)
Biological findings		
Hematology		
Anemia – n/N, % (95% CI)	108/824	13.1 (10.8–15.4)
Cytopenia – n/N, % (95% CI)	45/824	5.5 (3.9–7.0)
Hemoglobin (g/dL) – n, median (IQR)	80	7.8 (6.8–10.4)
Platelet (G/L) – n, median (IQR)	37	158 (83–276)
White blood cell (G/L) – n, median (IQR)	30	5.615 (4.500–7.900)
Biochemistry, blood – n, median (IQR)		
Homocysteine (μmol/L)	288	92 (54–141)
Methionine (μmol/L)	136	13.0 (7.1–21.5)
C3 (μmol/L)	105	9.9 (6.9–14.2)
MMA (μmol/L)	94	19 (4–53)
B ₁₂ (pmol/L)	52	389 (171–601)
Ammonia (μmol/L)	42	174 (123–350)
Biochemistry, urine – n, median (IQR)		
MMA (mM/mol creatine)	213	1,056 (272–3607)
Imaging and electrophysiological findings – n/N, % (95% CI)		
Brain MRI	175/824	21.2 (19.8–22.7)
Abnormal signal	89/175	50.1 (43.2–58.5)
Cerebral atrophy	52/175	29.7 (23.1–37.1)
MRI without abnormality	46/175	26.3 (19.9–33.5)
Abnormal EMG finding	23/824	2.8 (1.7–3.9)
Abnormal EEG finding [†]	17/824	2.1 (1.1–3.0)
Therapy – n/N, % (95% CI)		
Vitamin B ₁₂ supplementation	316/824	38.3 (35.0–41.7)
Liver transplantation	16/824	1.9 (1.0–2.9)
Kidney transplantation	14/824	1.7 (0.8–2.6)

MMACHC, metabolism of cobalamin associated C; MMA, methylmalonic acid; MRI, magnetic resonance imaging; EEG, electroencephalography; EMG, electromyography; IQR, interquartile range; Ref, reference values.

[‡]One patient had two mutations for the *ZNF143* gene and was not classified in the four gene clusters.

[§]Gene cluster “B₁₂ bioavailability” regroups all patients with *CBLIF* (alias, *GIF*), *CUBN*, *AMN*, *TCN2*, *LMBRD1*, *CD320*, or *ABCD4* variants.

[¶]Gene cluster “cytoplasmic transport” regroups all patients with *MMACHC* and *MMADHC* variants responsible for combined mitochondrion and remethylation abnormalities.

^{‡‡}Gene cluster “remethylation” regroups all patients with *MTR*, *MTRR*, and *MMADHC* variants responsible for remethylation abnormalities.

^{§§}Gene cluster “mitochondrion” regroups all patients with *MMAA*, *MMAB*, or *MMUT* variants and *MMADHC* variants responsible for mitochondrion abnormalities.

^{††}Abnormal EEG pattern other than seizures.



Table 2. Clinical, biological, radiological, and electrophysiological findings of the 824 patients included in the individual patient-level meta-analysis according to age subgroups

	Patients under 1 year	Patients between 1 and 14 years	Patients over 15 years
Demographic data			
Age (years) – n; median (IQR)	509; 0.0 (0.0–0.3)	133; 4.0 (2.0–9.0)	74; 20.0 (18.0–29.0)
Male gender – n/N; % (95% CI)	212/383; 55.4 (50.4–60.4)	52/119; 43.7 (34.7–52.7)	32/65; 49.2 (36.7–61.7)
Gene – n/N; % (95% CI)			
<i>MMACHC</i>	226/509; 44.4 (40.1–48.7)	76/133; 57.1 (48.6–65.7)	68/74; 91.9 (85.5–98.3)
<i>MMUT</i>	192/509; 37.7 (33.5–41.9)	27/133; 20.3 (13.4–27.2)	4/74; 5.4 (1.3–10.7)
<i>MMAA</i>	31/509; 6.1 (4.0–8.2)	8/133; 6.0 (1.9–10.1)	1/74; 1.4 (0.0–4.0)
<i>MMAB</i>	25/509; 4.0 (3.0–6.8)	1/133; 0.8 (0.0–2.2)	0/74; 0.0 (0.0–0.0)
<i>TCN2</i>	12/509; 2.4 (1.0–3.7)	1/133; 0.8 (0.0–2.2)	0/74; 0.0 (0.0–0.0)
<i>MMADHC</i>	10/509; 2.0 (1.6–3.2)	4/133; 3.0 (0.0–0.6)	0/74; 0.0 (0.0–0.0)
<i>MTRR</i>	4/509; 0.8 (0.0–1.6)	3/133; 2.3 (0.0–4.8)	1/74; 1.4 (0.0–4.0)
<i>MTR</i>	3/509; 0.6 (0.0–1.3)	0/133; 0.0 (0.0–0.0)	0/74; 0.0 (0.0–0.0)
<i>ABCD4</i>	2/509; 0.4 (0.0–0.1)	2/133; 1.5 (0.0–3.6)	0/74; 0.0 (0.0–0.0)
<i>LMRD1</i>	2/509; 0.4 (0.0–0.1)	0/133; 0.0 (0.0–0.0)	0/74; 0.0 (0.0–0.0)
<i>CD320</i>	1/509; 0.2 (0.0–0.0)	0/133; 0.0 (0.0–0.0)	0/74; 0.0 (0.0–0.0)
<i>ZF143</i>	1/509; 0.2 (0.0–0.0)	0/133; 0.0 (0.0–0.0)	0/74; 0.0 (0.0–0.0)
<i>AMN</i>	0/509; 0.0 (0.0–0.0)	6/133; 4.5 (0.9–8.1)	0/74; 0.0 (0.0–0.0)
<i>CBLIF</i> (alias, <i>GIF</i>)	0/509; 0.0 (0.0–0.0)	3/133; 2.3 (0.0–4.8)	0/74; 0.0 (0.0–0.0)
<i>CUBN</i>	0/509; 0.0 (0.0–0.0)	2/133; 1.5 (0.0–3.6)	0/74; 0.0 (0.0–0.0)
Gene clusters^a – n/N; % (95% CI)			
Mitochondrion ^d	251/508; 49.4 (45.0–53.8)	37/133; 27.8 (20.1–35.5)	5/74; 6.8 (0.9–12.6)
Cytoplasmic transport ^c	232/508; 45.7 (41.3–50.0)	77/133; 57.9 (49.4–66.4)	68/74; 91.9 (85.5–98.3)
B ₁₂ bioavailability ^b	17/508; 3.4 (1.8–4.9)	14/133; 10.5 (5.2–15.8)	0/74; 0.0 (0.0–0.0)
Remethylation ^a	8/508; 1.6 (0.5–2.7)	5/133; 3.8 (0.5–7.1)	1/74; 1.4 (0.0–4.0)
Clinical findings			
Neurological manifestations – n/N; % (95% CI)			
Developmental delay	40.5; (36.2–44.7)	52/133; 39.1 (30.7–47.5)	24/74; 32.4 (21.5–43.4)
Hypotony	107/509; 21.0 (17.5–24.6)	16/133; 12.0 (6.4–1.8)	0/74; 0.0 (0.0–0.0)
Seizures	48/509; 9.4 (6.9–12.0)	20/133; 15.0 (8.9–21.2)	11/74; 14.9 (6.6–23.2)
Microcephaly	21/509; 4.1 (2.4–5.9)	1/133; 0.8 (0.0–2.2)	0/74; 0.0 (0.0–0.0)
Walking difficulty	16/509; 3.1 (1.6–4.7)	20/133; 15.0 (8.9–21.2)	28/74; 37.8 (26.5–49.2)
Peripheral neuropathy	16/509; 3.1 (1.6–4.7)	21/133; 15.8 (9.6–22.1)	22/74; 29.7 (19.1–40.4)
Extra pyramidal syndrome	14/509; 2.8 (1.3–4.2)	6/133; 4.5 (0.9–8.1)	8/74; 10.8 (3.6–18.1)
Pyramidal syndrome	10/509; 2.0 (0.9–3.2)	6/133; 4.5 (0.9–8.1)	19/74; 25.7 (15.5–35.9)
Digestive manifestations – n/N; % (95% CI)			
Feeding intolerance	156/509; 30.6 (26.6–34.7)	33/133; 24.8 (17.4–32.2)	3/74; 4.1 (0.0–8.7)
Multiple organ failure – n/N; % (95% CI)			
Death	87/509; 17.1 (13.8–20.4)	10/133; 7.5 (5.2–9.8)	4/74; 5.4 (1.3–10.7)
Acute metabolic decompensation	82/509; 16.1 (12.9–19.3)	12/133; 9.0 (4.1–14.0)	4/74; 5.4 (1.3–10.7)
Ophthalmologic manifestations – n/N; % (95% CI)			
Nystagmus	55/509; 10.8 (8.1–13.5)	6/133; 4.5 (0.9–8.1)	2/74; 2.7 (0.0–6.5)
Maculopathy or retinopathy	52/509; 10.2 (7.6–12.9)	5/133; 3.8 (0.5–7.0)	5/74; 6.8 (0.9–12.6)
Strabismus	23/509; 4.5 (2.7–6.3)	1/133; 0.8 (0.0–2.2)	0/74; 0.0 (0.0–0.0)
Renal manifestations – n/N; % (95% CI)			
Chronic kidney disease	37/509; 7.3 (5.0–9.5)	12/133; 9.0 (4.1–14.0)	7/74; 9.5 (2.6–16.3)
Acute kidney failure or HUS	21/509; 4.1 (2.4–5.9)	14/133; 10.5 (5.3–15.8)	2/74; 2.7 (0.0–6.5)
Cardiovascular manifestations – n/N; % (95% CI)			
Cardiomyopathy	17/509; 3.3 (1.8–4.9)	7/133; 5.3 (1.4–9.1)	2/74; 2.7 (0.0–6.5)

(Continued on next page)



Table 2. Continued

	Patients under 1 year	Patients between 1 and 14 years	Patients over 15 years
Pulmonary hypertension	4/509; 0.8 (0.0–1.6)	11/133; 8.3 (3.5–13.0)	1/74; 1.4 (0.0–4.0)
Thrombosis	3/509; 0.6 (0.0–1.3)	5/133; 3.8 (0.5–7.0)	5/74; 6.8 (0.9–12.6)
High blood pressure	2/509; 0.4 (0.0–0.9)	9/133; 6.8 (2.4–11.1)	9/74; 12.2 (4.5–19.8)
Psychiatric manifestations – n/N; % (95% CI)			
Behavior abnormality	11/509; 2.2 (0.9–3.4)	8/133; 6.0 (1.9–10.1)	4/74; 5.4 (1.3–10.7)
Psychiatric disorders	8/509; 1.6 (0.5–2.7)	18/133; 13.5 (7.6–19.4)	25/74; 33.8 (22.8–44.8)
Miscellaneous manifestations – n/N; % (95% CI)			
Intrauterine growth restriction	8/509; 1.6 (0.5–2.7)	3/133; 2.7 (0.0–4.8)	1/74; 1.4 (0.0–4.0)
Gout	5/509; 1.0 (0.1–1.8)	0/133; 0.0 (0.0–0.0)	0/74; 0.0 (0.0–0.0)
Dermatologic abnormality	1/509; 0.2 (0.0–0.6)	4/133; 3.0 (0.0–6.0)	1/74; 1.4 (0.0–4.0)
Pregnancy	0/509; 0.0 (0.0–0.0)	2/133; 1.5 (0.0–3.6)	2/74; 2.7 (0.0–6.5)
Biological findings			
Hematology			
Anemia – n/N; % (95% CI)	42/509; 8.3 (5.9–10.6)	47/133; 35.3 (27.1–43.6)	11/74; 14.9 (6.6–23.2)
Cytopenia – n/N; % (95% CI)	23/509; 4.5 (2.7–6.3)	18/133; 13.5 (7.6–19.4)	3/74; 4.1 (0.0–8.7)
Hb (g/dL) – n; median (IQR)	25; 7.3 (6.5–10.0)	36; 7.9 (7.0–10.3)	9; 8.9 (7.8–11.6)
WBC (G/L) – n; median (IQR)	16; 4.995 (3.693–7.025)	13; 7.000 (4.900–10.200)	0; –
Platelet (G/L) – n; median (IQR)	15; 83 (21.5–263.5)	20; 199 (122–292.5)	2; 128.5 (82–175)
Biochemistry, blood – n, median (IQR)			
Homocysteine (μmol/L)	137; 92 (50–157)	64; 90 (59–123)	60; 99 (67–117)
Methionine (μmol/L)	77; 117–14	22; 1,912–25	15; 98–16
C3-Carnitine (μmol/L)	69; 10.4 (6.5–14.1)	17; 7.9 (7.1–11.2)	7; 11.2 (7.8–15.5)
MMA (μmol/L)	66; 20 (4–93)	9; 296–14	9; 22 (8–70)
Ammonia (μmol/L)	31; 198 (141–402)	3; 206 (113–232)	6; 3215–54
B ₁₂ (pmol/L)	21; 362 (181–573)	22; 396 (112–611)	7; 428 (380–738)
Biochemistry, urine – n, median (IQR)			
MMA (mM/mol creatine)	131; 1,940 (550–4,663)	44; 950 (173–2,801)	22; 486 (244–1,009)
Imaging and electrophysiological findings – n/N, % (95% CI)			
Head MRI	61/509; 12.0 (9.2–14.8)	41/133; 30.8 (22.9–38.8)	35/74; 47.3 (35.7–58.9)
Abnormal signal reported	39/61; 64.0 (51.9–76.0)	17/41; 41.5 (26.4–56.5)	9/35; 25.7 (11.2–40.2)
Without abnormality	20/61; 32.8 (21.0–44.6)	5/41; 12.2 (2.2–22.2)	7/35; 20.0 (6.7–33.2)
Cerebral atrophy reported	8/61; 13.1 (4.6–21.6)	22/41; 53.7 (38.4–68.9)	21/35; 60.0 (43.8–76.2)
Abnormal EEG finding reported ^d	61/509; 12.0 (9.2–14.8)	6/133; 4.5 (0.9–8.1)	2/74; 2.7 (0.0–6.5)
Abnormal EMG finding reported	39/61; 64.0 (51.9–76.0)	7/133; 5.3 (1.4–9.1)	14/74; 18.9 (9.8–28.1)
Therapy – n/N, % (95% CI)			
Vitamin B ₁₂ supplementation	156/509; 30.6 (26.6–34.7)	66/133; 49.6 (45.3–54.0)	56/74; 75.7 (65.7–85.7)
Kidney transplantation	13/509; 2.6 (1.2–3.9)	0/133; 0.0 (0.0–0.0)	1/74; 1.4 (0.0–4.0)
Liver transplantation	15/509; 3.0 (1.5–4.4)	0/133; 0.0 (0.0–0.0)	0/74; 0.0 (0.0–0.0)

MMACHC, metabolism of cobalamin associated C; MMA, methylmalonic acid; HUS, hemolytic-uremic syndrome; Hb, hemoglobin; WBC, white blood cell; MRI, magnetic resonance imaging; EEG, electroencephalography; EMG, electromyography; IQR, interquartile range; Ref, reference values.

^aOne patient had two mutations for the *ZNF143* gene and was not classified in the four gene clusters.

^bGene cluster “B₁₂ bioavailability” regroups all patients with *CBLIF* (alias, *GIF*), *CUBN*, *AMN*, *TCN2*, *LMBRD1*, *CD320*, or *ABCD4* variants.

^cGene cluster “cytoplasmic transport” regroups all patients with *MMACHC* and *MMADHC* variants responsible for combined mitochondrion and remethylation abnormalities.

^dGene cluster “mitochondrion” regroups all patients with *MMAA*, *MMAB*, or *MMUT* variants and *MMADHC* variants responsible for mitochondrion abnormalities.

^eGene cluster “remethylation” regroups all patients with *MTR*, *MTRR*, and *MMADHC* variants responsible for remethylation abnormalities.

^fAbnormal EEG pattern other than seizures.



Table 3. Clinical, biological, radiological, and electrophysiological findings of the 824 patients included in the individual patient-level meta-analysis according to functional gene clusters

	Cytoplasmic transport ^a	Mitochondrion ^b	B ₁₂ bioavailability ^d	Remethylation ^c
Demographic data				
Age (years) – n, median (IQR)	377; 0.3 (0.0–10.3)	293; 0.1 (0.0–0.7)	31; 0.3 (0.2–2.1)	14; 0.3 (0.1–5.0)
Age, 0 to 1 – n/N, % (95% CI)	232/377; 61.5 (56.6–66.5)	251/293; 85.7 (81.6–89.7)	17/31; 54.8 (36.3–73.4)	8/14; 57.1 (56.5–79.5)
Age, 1 to 14 years included – n/N, % (95% CI)	77/377; 20.4 (16.3–24.5)	37/293; 12.6 (8.8–16.5)	14/31; 45.2 (26.6–63.7)	5/14; 35.7 (7.0–64.4)
Age, 15 years and more – n/N, % (95% CI)	68/377; 18.0 (14.1–21.9)	5/293; 1.7 (0.2–3.2)	0/31; 0.0 (0.0–0.0)	1/14; 7.1 (0.0–22.6)
Male gender – n/N, % (95% CI)	196/361; 54.3 (49.1–59.5)	116/214; 54.2 (47.5–60.9)	11/31; 35.5 (17.6–53.3)	5/14; 35.7 (7.0–64.4)
Clinical findings				
Neurological manifestations – n/N, % (95% CI)				
Developmental delay	147/416; 35.3 (30.7–39.9)	142/353; 40.2 (35.1–45.4)	15/32; 46.9 (28.6–65.2)	10/22; 45.5 (22.9–68.1)
Hypotony	64/416; 15.4 (11.9–18.9)	75/353; 21.2 (17.0–25.5)	2/32; 6.3 (0.0–15.1)	4/22; 18.2 (0.7–35.7)
Seizures	59/416; 14.2 (10.8–17.5)	2 ² / ₃ ; 53; 6.2 (3.7–8.8)	1/32; 3.1 (0.0–9.5)	4/22; 18.2 (0.7–35.7)
Peripheral neuropathy	49/416; 11.8 (8.7–14.9)	3/353; 0.9 (0.0–1.8)	4/32; 12.5 (0.4–24.6)	8/22; 36.4 (14.5–58.2)
Walking difficulty	46/416; 11.1 (8.0–14.1)	8/353; 2.3 (0.7–3.8)	9/32; 28.1 (11.7–44.6)	3/22; 13.6 (0.0–29.2)
Pyramidal syndrome	25/416; 6.0 (3.7–8.3)	9/353; 2.6 (0.9–4.2)	0/32; 0.0 (0.0–0.0)	2/22; 9.1 (0.0–22.1)
Microcephaly	18/416; 4.3 (2.4–6.3)	2/353; 0.6 (0.0–1.4)	1/32; 3.1 (0.0–9.5)	2/22; 9.1 (0.0–22.1)
Extra pyramidal syndrome	12/416; 2.9 (1.3–4.5)	15/353; 4.3 (2.1–6.4)	1/32; 3.1 (0.0–9.5)	2/22; 9.1 (0.0–22.1)
Digestive manifestations – n/N, % (95% CI)				
Feeding intolerance	85/416; 20.4 (16.5–24.3)	97/353; 27.5 (22.8–32.2)	19/32; 59.4 (41.4–77.4)	3/22; 13.6 (0.0–29.2)
Ophthalmologic manifestations – n/N, % (95% CI)				
Nystagmus	70/416; 16.8 (13.2–20.4)	0/353; 0.0 (0.0–0.0)	0/32; 0.0 (0.0–0.0)	3/22; 13.6 (0.0–29.2)
Maculopathy or retinopathy	63/416; 15.1 (11.7–18.6)	4/353; 1.1 (0.0–2.2)	0/32; 0.0 (0.0–0.0)	0/22; 0.0 (0.0–0.0)
Strabismus	26/416; 6.3 (3.9–8.6)	0/353; 0.0 (0.0–0.0)	0/32; 0.0 (0.0–0.0)	0/22; 0.0 (0.0–0.0)
Psychiatric manifestations – n/N, % (95% CI)				
Psychiatric disorders	49/416; 11.8 (8.7–14.9)	2/353; 0.6 (0.0–1.4)	0/32; 0.0 (0.0–0.0)	1/22; 4.6 (0.0–14.0)
Behavior abnormality	22/416; 5.3 (3.1–7.5)	1/353; 0.3 (0.0–0.8)	0/32; 0.0 (0.0–0.0)	1/22; 4.6 (0.0–14.0)
Multiple organ failure – n/N, % (95% CI)				
Death	31/416; 7.5 (4.9–10.0)	74/353; 21.0 (16.7–25.2)	0/32; 0.0 (0.0–0.0)	2/22; 9.1 (0.0–22.1)
Acute metabolic decompensation	13/416; 3.2 (1.5–4.8)	93/353; 26.3 (21.7–31.0)	2/32; 6.3 (0.0–15.1)	1/22; 4.6 (0.0–14.0)
Cardiac or hemodynamic manifestations – n/N, % (95% CI)				
Cardiomyopathy	21/416; 5.1 (2.9–7.2)	4/353; 1.1 (0.0–2.2)	1/32; 3.1 (0.0–9.5)	0/22; 0.0 (0.0–0.0)
High blood pressure	19/416; 4.6 (2.6–6.6)	2/353; 0.6 (0.0–1.4)	0/32; 0.0 (0.0–0.0)	0/22; 0.0 (0.0–0.0)
Pulmonary hypertension	13/416; 3.2 (1.5–4.8)	3/353; 0.9 (0.0–1.8)	0/32; 0.0 (0.0–0.0)	0/22; 0.0 (0.0–0.0)
Thrombosis	10/416; 2.4 (0.9–3.9)	1/353; 0.3 (0.0–0.8)	1/32; 3.1 (0.0–9.5)	1/22; 4.6 (0.0–14.0)
Renal manifestations – n/N, % (95% CI)				
Acute kidney failure or HUS	24/416; 5.8 (3.5–8.0)	12/353; 3.4 (1.5–5.3)	1/32; 3.1 (0.0–9.5)	1/22; 4.6 (0.0–14.0)
Chronic kidney disease	16/416; 3.9 (0.0–8.8)	36/353; 10.2 (7.0–13.4)	6/32; 18.8 (4.5–33.0)	0/22; 0.0 (0.0–0.0)
Miscellaneous manifestations – n/N, % (95% CI)				
Intrauterine growth restriction	9/416; 2.2 (0.8–3.6)	2/353; 0.6 (0.0–1.4)	3/32; 9.4 (0.0–20.1)	1/22; 4.6 (0.0–14.0)
Pregnancy	3/416; 0.7 (0.0–1.5)	1/353; 0.3 (0.0–0.8)	0/32; 0.0 (0.0–0.0)	0/22; 0.0 (0.0–0.0)
Dermatologic abnormality	2/416; 0.5 (0.0–1.2)	1/353; 0.3 (0.0–0.8)	4/32; 12.5 (0.4–24.6)	0/22; 0.0 (0.0–0.0)
Gout	0/416; 0.0 (0.0–0.0)	5/353; 1.4 (0.2–2.7)	0/32; 0.0 (0.0–0.0)	0/22; 0.0 (0.0–0.0)

(Continued on next page)



Table 3. Continued

	Cytoplasmic transport ^a	Mitochondrion ^b	B ₁₂ bioavailability ^d	Remethylation ^c
Biological findings				
Complete blood count				
Anemia – n/N; % (95% CI)	52/416; 12.5 (9.3–15.7)	16/353; 4.5 (2.4–6.7)	25/32; 78.1 (63.0–93.3)	15/22; 68.2 (47.0–89.3)
Cytopenia – n/N; % (95% CI)	23/416; 5.5 (3.3–7.7)	8/353; 2.3 (0.7–3.8)	11/32; 34.4 (17.0–51.8)	3/22; 13.6 (0.0–29.2)
Hemoglobin (g/dL) – n; median (IQR)	37; 8.4 (7.1–10.4)	7; 9.2 (7.6–10.2)	18; 7.4 (5.4–11.2)	18; 7.5 (6.3–8.5)
WBC (G/L) – n; median (IQR)	8; 3.945 (2.520–6.295)	6; 8.870 (5.250–16.800)	15; 5.980 (4.600–7.300)	1; 7.900 (–)
Platelets (G/L) – n; median (IQR)	15; 144 (87–231)	6; 313 (276–419)	14; 103 (55–198)	2; 165 (–)
Blood metabolic findings – n, median (IQR)				
Homocysteine (μmol/L)	237; 99 (65–146)	11; 6.0 (5.1–9.3)	22; 4,726–60	18; 93 (71–136)
Methionine (μmol/L)	105; 127–21	5; 2,514–33	9; 1,915–21	17; 125–21
MMA (μmol/L)	72; 103–25	20; 270 (136–1040)	2; 148–17	0; –
C3-Carnitine (μmol/L)	58; 7.8 (5.8–11.2)	43; 13.0 (9.8–19.1)	3; 5.7 (4.2–8.8)	0; –
Vitamin B ₁₂ (pmol/L)	24; 501 (399–767)	6; 348 (216–750)	17; 149 (82–375)	5; 151 (105–240)
Ammonia (μmol/L)	7; 54 (26–108)	35; 199 (141–367)	0; –	0; –
Urine metabolic findings – n, median (IQR)				
MMA (mM/mol creatine)	109; 710 (216–2045)	95; 2,903 (603–5699)	9; 154 (70–804)	0; –
MRI, EEG, and EMG findings – n/N, % (95% CI)				
Head MRI	100/416; 24.0 (19.9–28.2)	62/353; 17.6 (13.6–21.6)	4/32; 12.5 (0.4–24.6)	8/22; 26.5 (11.5–41.4)
Abnormal signal reported	47/100; 47.0 (37.2–56.8)	36/62; 58.0 (46.7–71.3)	1/4; 25.0 (0.0–67.4)	4/8; 50.0 (15.4–84.6)
Cerebral atrophy reported	42/100; 42.0 (32.3–51.7)	4/62; 6.4 (0.3–12.8)	2/4; 50.0 (1.0–99.0)	4/8; 50.0 (15.4–84.6)
Without abnormality	17/100; 17.0 (9.6–24.4)	25/62; 40.3 (28.6–53.3)	1/4; 25.0 (0.0–67.4)	2/8; 25.0 (0.0–55.0)
Abnormal EMG finding reported	20/416; 4.8 (2.7–6.9)	0/353; 0.0 (0.0–0.0)	1/32; 3.1 (0.0–20.8)	2/22; 9.1 (0.0–22.1)
Abnormal EEG finding reported ^e	14/416; 3.4 (1.6–5.1)	1/353; 0.3 (0.0–0.8)	0/32; 0.0 (0.0–0.0)	2/22; 9.1 (0.0–22.1)
Therapy – n/N, % (95% CI)				
Vitamin B ₁₂ supplementation	191/416; 45.9 (41.1–50.7)	73/353; 20.4 (15.6–25.2)	30/32; 93.8 (84.9–100.0)	21/22; 95.5 (86.0–100.0)
Liver transplantation	0/416; 0.0 (0.0–0.0)	16/353; 4.5 (2.4–6.7)	0/32; 0.0 (0.0–0.0)	0/22; 0.0 (0.0–0.0)
Kidney transplantation	0/416; 0.0 (0.0–0.0)	14/353; 4.0 (1.9–6.0)	0/32; 0.0 (0.0–0.0)	0/22; 0.0 (0.0–0.0)

MMACHC, methylmalonic aciduria and homocystinuria type C protein; MMA, methylmalonic acid; MRI, magnetic resonance imaging; EEG, electroencephalography; EMG, electromyography.

One patient had two mutations for the *ZNF143* gene, which is not classified in these gene clusters.

^aGene cluster “cytoplasmic transport” regroups all patients with *MMACHC* and *MMADHC* variants responsible for combined mitochondrion and remethylation abnormalities.

^bGene cluster “mitochondrion” regroups all patients with *MMAA*, *MMAB*, or *MMUT* variants and *MMADHC* variants responsible for mitochondrion abnormalities.

^cGene cluster “remethylation” regroups all patients with *MTR*, *MTRR*, and *MMADHC* variants responsible for remethylation abnormalities.

^dGene cluster “B₁₂ bioavailability” regroups all patients with *CBLIF* (alias, *GIF*), *CUBN*, *AMN*, *TCN2*, *LMBRD1*, *CD320*, or *ABCD4* variants.

^eAbnormal EEG pattern other than seizures.

95% CI: 5.21–28.46); behavior abnormality (OR, 11.31; 95% CI: 2.64–48.41); high blood pressure (OR, 9.69; 95% CI: 2.24–41.88); abnormal EMG finding (OR, 6.80; 95% CI: 2.01–23.07); peripheral neuropathy (OR, 3.49; 95% CI: 1.92–6.33); seizures (OR, 2.33; 95% CI: 1.44–3.75); and homocysteine (for each 10 μmol/L increment) (OR, 1.14; 95% CI: 1.07–1.22) (Figure 3A; Table S6, related to Tables 1–4). When compared with the B₁₂ bioavailability gene cluster as a reference comparator, the following items were significantly associated with an increased risk of belonging to the cytoplasmic transport functional gene cluster, in the descending order of ORs: vitamin B₁₂ (for each 100 pmol/L increment) (OR, 2.58; 95% CI: 1.44–

4.63) and homocysteine (for each 10 μmol/L increment) (OR: 1.30; 95% CI: 1.14–1.49) (Table S6, related to Tables 1–4).

Mitochondrion gene cluster

We classified 353 patients in the mitochondrion gene cluster. The median age was 0.1 years (IQR, 0–0.7). A total of 85.7% of the patients were under 1 year old (251/293), 12.6% were between 1 and 14 years old (37/293), and 1.7% were over 15 years old (5/293) (Table 3). Development delay (40.2%, 142/353) and hypotonia (21.2%, 75/353) were the most frequently reported manifestations. Acute metabolic decompensation occurred in 26.3% (93/353) of the patients and digestive manifestations occurred in 27.5% (97/353). Death was reported in 21.0% (74/353) of cases. Few ophthalmological manifestations



Table 4. Comparison of the characteristics and clinical, biological, and imaging findings between the 161 patients with Cb/C from the E-HOD registry and the 416 patients within the "cytoplasmic transport" cluster from the individual patient data meta-analysis

	E-HOD registry – Cb/C n = 161	Individual patient data meta-analysis, "cytoplasmic transport" cluster, n = 416	p value
Patients' characteristics			
Gender (male) – n/N, %	93/161, 57.7	196/361, 54.3	0.47
Pre-clinically diagnosed – n/N, %	47/161, 29.2	38/416 ^a , 9.1	<0.0001
Age at first symptoms (years) – n, median (IQR)	93, 0.1 (0.0–0.3)	377, 0.3 (0.0–10.3)	NS
Mutations reported – n/N, %	117/191, 61.3	416/416, 100	<0.0001
Clinical findings – n/N, %			
Thromboembolic events			
Stroke	3/113, 2.7	8/416, 1.9	0.60
Thromboembolic manifestations	5/113, 4.4	10/416, 2.4	0.26
Renal manifestations			
Hemolytic uremic syndrome	17/113, 15.0	24/416, 5.8	0.001
Chronic kidney disease	2/113, 1.7	16/416, 3.9	0.25
Cardiac disease			
Cardiomyopathy/cardiac malformation	5/113, 8.8	21/416, 5.1	0.14
Cardiac arrest/heart failure/death	2/113, 1.7	31/416, 7.5	0.02
Arterial hypertension	3/113, 2.7	19/416, 4.6	0.37
Digestive and liver manifestations			
Feeding problems	68/113, 60	85/416, 20.4	<0.0001
Hepatomegaly	9/113, 8.0	6/416, 1.4	0.0002
Acute manifestation			
Metabolic crises	20/113, 18	13/416, 3.2	<0.0001
Ophthalmological manifestations			
Eye disease (optic nerve disease)	20/113, 18	100/416, 24.0	0.18
Nystagmus	NR in E-HOD registry	70/416, 16.8	no data for comparison
Maculopathy or retinopathy	NR in E-HOD registry	63/416, 15.1	no data for comparison
Strabismus	NR in E-HOD registry	26/416, 6.3	no data for comparison
Psychiatric manifestations			
Psychiatric disorders	6/113, 5	49/416, 11.8	0.04
Behavior abnormality	NR	22/416, 5.3	no data for comparison
Neurological manifestations			
Muscular hypotonia	38/113, 34	64/416, 15.4	<0.0001
Developmental delay	26/113, 23	147/416, 35.3	0.01
Seizures	19/113, 17	59/416, 14.2	0.46
Brain malformation	3/113, 3	not reported in the study	no data for comparison
Microcephaly	9/113, 8	18/416, 4.3	0.11
Hydrocephalus	5/113, 4	not reported in the study	no data for comparison
Myelopathy	4/113, 3	49/416; 11.8	0.006
Peripheral neuropathy	NR in E-HOD registry	49/416; 11.8	no data for comparison
Walking difficulty	NR in E-HOD registry	46/416; 11.1	no data for comparison
Pyramidal syndrome	NR in E-HOD registry	25/416; 6.0	no data for comparison
Extrapyramidal syndrome	NR in E-HOD registry	12/416; 2.9	no data for comparison
Laboratory findings			
Homocysteine before treatment μmol/L – n, median (IQR)	139, 123 (65–197)	237, 99 (65–146)	NS
Anemia – n/N, %	32/113, 28	52/416, 12.5	0.0001

(Continued on next page)

Table 4. Continued

Imaging findings			
Abnormal MRI signal reported	NR in E-HOD registry	47/100; 47.0	no data for comparison
Cerebral atrophy reported on MRI	NR in E-HOD registry	42/100; 42.0	no data for comparison
Abnormal EMG findings reported	NR in E-HOD registry	20/416; 4.8	o data for comparison

NR, not reported; NS, not significant.

^aThe 38 children diagnosed by Newborn Screening are described in Table S9. List of publications including patients with an inborn error of vitamin B₁₂ metabolism diagnosed by newborn screening. Related to Tables 1–4.

or cardiological manifestations were noticed. Cerebral atrophy on brain MRI was only noticed in 6.4% of the case (4/62), whereas an abnormal signal was reported in 58.0% (36/62). Liver transplantation was performed in 4.5% of cases (16/353). Among the 190 *MMUT* variants described, c.572C > A (27 occurrences) and c.655A > T (21 allele occurrences) were the most frequent (Table S3, related to Tables 1–4). The pathogenic c.433C > T variant was the most frequent among the 31 *MMAA* variants, with 27 allele occurrences (Table S4, related to Tables 1–4). Most of the variants reported in *MMAB* were pathogenic and associated with early onset (Table S5, related to Tables 1–4). In logistic regression analysis with Bonferroni correction, the following items were significantly associated with an increased risk of belonging to the mitochondrion functional gene cluster, when compared with the remaining functional gene clusters in the descending order of ORs: acute metabolic decompensation (OR, 0.15; 95% CI: 5.84–17.63); 0 to 1 year age category (OR, 3.83; 95% CI: 2.62–5.62); death (OR, 3.51; 95% CI: 2.27–5.44); C3-carnitine ($\mu\text{mol/L}$) (OR, 1.24; 95% CI: 1.12–1.38); MMA, urine (for each per 500 mmol/mol creatinine increment) (OR, 1.17; 95% CI: 1.09–1.25); and MMA, blood (for each per 10 $\mu\text{mol/L}$ increment) (OR, 1.14; 95% CI: 1.07–1.23) (Figure 3B; Table S6, related to Tables 1–4).

B₁₂ bioavailability gene cluster

We classified 32 patients in the B₁₂ bioavailability gene cluster. The median age was 0.3 years (IQR, 0.2–2.1). A total of 54.8% (17/31) of the patients were less than 1 year old and 45.2% (14/31) were in the 1–14-year-old subgroup (Table 3). Anemia was the most frequently reported manifestation (78.1%, 25/32), followed by feeding intolerance (59.4%, 19/32) and development delay (46.9%, 15/32). No seizures were noticed, and no other abnormal EEG patterns were reported. No ophthalmological or psychiatric manifestations were observed. Only one patient with cardiological manifestation was reported. Chronic kidney disease was observed in 18.8% (6/32), dermatologic abnormalities in 12.5% (4/32), and intrauterine growth restriction in 9.4% (3/32). Cytopenia was noticed in 34.4% (11/32) despite B₁₂ supplementation in as much as 93.8% (30/32) of patients. In logistic regression analysis with Bonferroni correction, the following items were significantly associated with an increased risk of belonging to the B₁₂ bioavailability functional gene cluster when compared with the remaining functional gene clusters in the descending order of ORs: cytopenia (OR, 11.66; 95% CI: 5.21–26.12); walking difficulty (OR, 5.04; 95% CI: 2.23–11.40); feeding intolerance (OR, 4.79; 95% CI: 2.32–9.88); 1 to 14 years age category (OR, 3.91; 95% CI: 1.88–8.15); and vitamin B₁₂ (per 100 pmol/L) (OR,

0.57; 95% CI: 0.39–0.82) (Table S6, related to Tables 1–4; Figure S2A, related to Tables 1 and 3).

Remethylation gene cluster

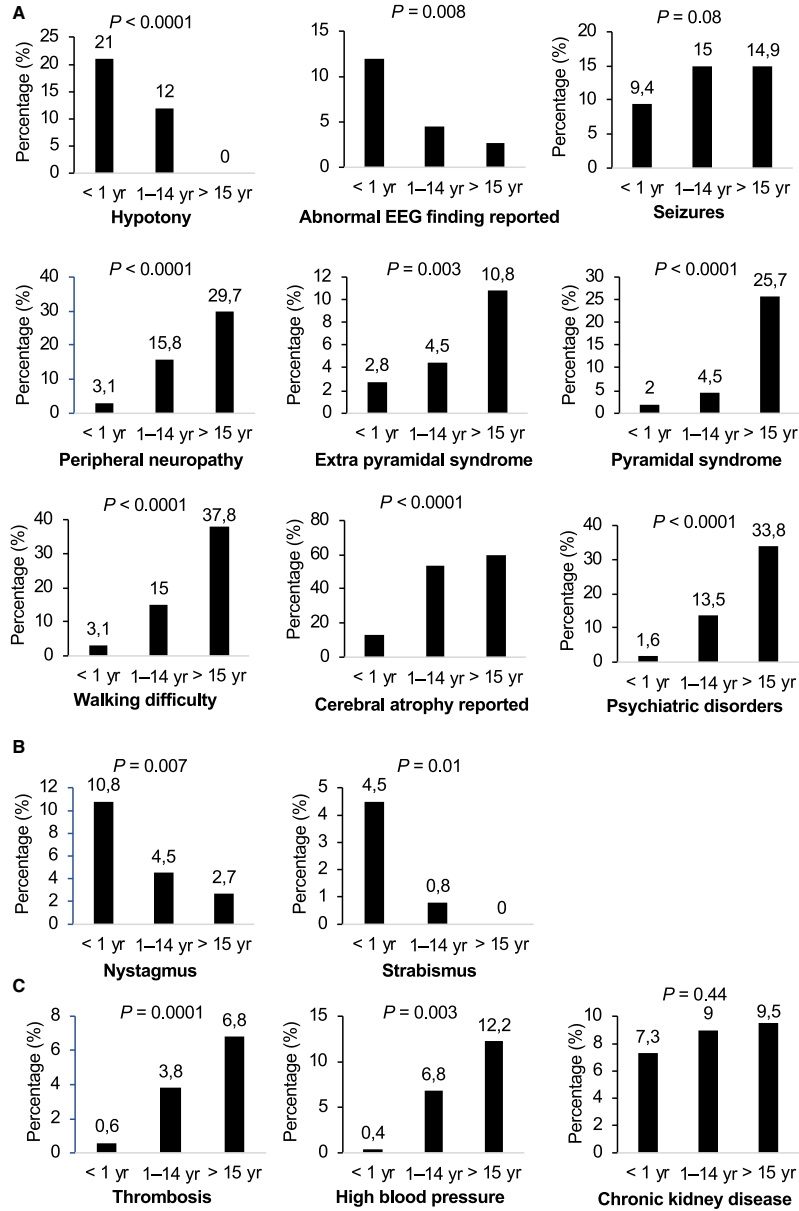
We classified 22 patients in the remethylation cluster. The median age was 0.3 years (IQR, 0.1–5.0), with 57.1% (8/14) reported as younger than 1 year, and only one patient older than 15 years (7.1%) (Table 3). As expected, anemia was a predominant manifestation observed in 68.2% (15/22). Neurological manifestations were also frequently observed, with 45.5% (10/22) of the patients exhibiting developmental delay, 36.4% (8/22) peripheral neuropathy, and 18.2% (4/12) seizures and hypotonia. A total of 9.1% (2/22) of the patients had abnormal EEG finding reported and 9.1% (2/22) had abnormal EMG finding reported. A total of 95.5% (21/22) of the patients were supplemented with vitamin B₁₂. In logistic regression analysis with Bonferroni correction, only peripheral neuropathy (OR, 7.60; 95% CI: 3.06–18.89) was significantly associated with an increased risk of belonging to the remethylation functional gene cluster when compared with the remaining functional gene clusters (Table S6, related to Tables 1–4; Figure S2B, related to Tables 1 and 3).

Metabolic characteristics according to the presence of anemia, neurological manifestations, or both or neither of these two manifestations

Hematological manifestations associated with neurological manifestations were mainly observed in the B₁₂ bioavailability gene cluster with a combined increase of homocysteine and methylmalonic acid and decreased methionine. The methionine concentration was significantly higher in cases with anemia and without neurological manifestations than in those with anemia and neurological manifestations or neurological manifestations only. The concentrations of urinary methylmalonic acid were significantly lower in cases with anemia associated with neurological manifestations than those with neurological manifestations without anemia (Table S7, related to Tables 1–4).

Assessment of predictors associated with death

In logistic regression analysis with Bonferroni correction, the following items were significantly associated with an increased risk of death, in the descending order of ORs: pulmonary hypertension (OR, 7.08; 95% CI: 2.60–19.29); mitochondrion functional gene cluster (OR, 3.51; 95% CI: 2.27–5.44); pathogenic variants on the *MMUT* gene (OR, 3.47; 95% CI: 2.29–5.25); acute metabolic decompensation (OR, 3.29; 95% CI: 2.04–5.31); and 0 to 1 year age category (OR, 2.84; 95% CI: 1.58–5.12). Conversely, the following predictors were significantly associated with a decreased risk of death, in the descending order of ORs: pathogenic variants on the *MMACHC* (OR, 0.36;



(legend on next page)

95% CI: 0.23–0.56); cytoplasmic transport functional gene cluster (OR, 0.35; 95% CI: 0.23–0.55); head MRI performed (OR, 0.34; 95% CI: 0.17–0.67); and nystagmus (OR, 0.08; 95% CI: 0.01–0.60) (Table S8, related to Tables 1–4; Figure S3, related to Tables 1 and 3).

DISCUSSION

Our study investigated the clinical and metabolic characteristics of a group of rare diseases of metabolism, in this case of vitamin B₁₂, by a systematic extraction of more than 800 individual reports of genetically proven cases, using the names of diseases and related genes and protein/enzymes. We extracted all the manifestations described in the reports and built a database that allowed us to characterize the main clinical, imaging, and biological metabolic manifestations of these diseases according to patient age and functional gene cluster groups. So far, the characteristics of this group of diseases have been reported in narrative reviews or registry studies focused on pediatric recruitment and only part of inborn errors of intracellular metabolism of vitamin B₁₂. We classified the patients into age categories defined in function of clinical practice and medical care.¹⁷¹ During the first year of life, clinical manifestations of inherited disorders may be severe and require pediatric expertise.¹⁷² The >15 years period of life includes late adolescence (15–19 years) and young adulthood (20–24 years). In this period, pediatric expertise is less necessary, and most cases are in adult care and examined by family physicians.^{171,173} Our study highlighted the strong association of manifestations with age and functional gene clusters. We showed that clinical manifestations diagnosed in late adolescence/adulthood differ from those usually observed in pediatric practice. We pointed out the need to revise the rationale for investigating the cause of these manifestations, for which the involvement of inborn errors of intracellular metabolism of vitamin B₁₂ is probably often overlooked in medical practice.

Our study shows that patients older than 15 years had a distinct clinical presentation and exhibited genetic variants with less pathogenicity than newborns and children. In particular, we observed a strong association of specific neurological and cardiovascular manifestations with age, as shown in Figure 2. Some manifestations also predominated explicitly in one of the four functional gene clusters. They could reflect specific pathomechanisms related to impaired methionine synthesis or methylmalonyl-CoA catabolism. For example, peripheral neuropathies and psychiatric manifestations were predominantly reported in the remethylation cluster, episodes of acute metabolic decompensation and renal or hemolytic-uremic syndrome manifestations in the mitochondrion cluster, and cardiovascular and ophthalmological manifestations in the cytoplasmic transport cluster. Anemia was the predominant outcome reported in the

clusters related to B₁₂ availability and remethylation pathways (Table 2).

Hematological findings were primarily reported in children and were not as frequent as reported in reviews dedicated to manifestations of inborn errors of vitamin B₁₂.^{164,174,175} In the B₁₂ bioavailability cluster, we observed that cases with anemia and no neurological manifestation had higher methionine and lower methylmalonic acid and no difference in homocysteine compared with those with neurological manifestation and no anemia (Table S7, related to Tables 1–4). These metabolic differences illustrate the need to study the molecular mechanisms that could specifically trigger anemia versus neurological manifestations, including the cobalamin partitioning toward methionine synthase and methylmalonyl-CoA mutase, the interactome of methionine synthase with methionine synthase reductase, *MMCHC*, and *MMADHC*, and the cellular status in methionine.^{176,177} The cellular status in folate could play a role in the increased methylmalonic acid concentration observed in cases of the B₁₂ bioavailability cluster with neurological manifestations since a high folate status increases methylmalonic acid in subjects with low blood concentrations of B₁₂.¹⁷⁸

Neurological manifestations, such as walking difficulties, peripheral neuropathy, and pyramidal syndrome, were observed in almost one-third of patients over 15 years and were strongly dependent on age. MRI brain imaging clearly showed an age-related increase of cerebral atrophy, with over 60% of cases reported in adulthood, compared with only 13% in newborns (Table 2; Figure 2). These data are consistent with cohort studies of elderly subjects, which showed a link between vitamin B₁₂ status and brain atrophy during aging and a preventive effect of vitamin B₁₂ therapy.^{179,180} These manifestations are linked to the impaired endogenous synthesis of methionine rather than to the catabolism of methylmalonyl-CoA. Indeed, they were mainly observed in patients in the remethylation and cytoplasmic transport functional gene clusters, but not in those in the mitochondrial cluster, as shown in Table S6 (related to Tables 1–4). These results are consistent with recent experimental studies on cellular models, patients' fibroblasts, and animal models. In these studies, the cellular deficit in B₁₂ altered the nucleo-cytoplasmic transport and splicing of mRNAs and increased reticulum stress.^{181–183} The altered shuttling of RNAs results from the decrease in SIRT1 (Sirtuin 1, also known as NAD-dependent protein deacetylase sirtuin-1) expression and imbalanced phosphorylation and methylation of RNA binding proteins, including ELAV1 (ELAV-like RNA binding protein 1, also known as human antigen R).¹⁸⁴ It produces an altered expression of genes needed for neurodevelopment and neuroplasticity and inhibits neuronal proliferation and differentiation.^{181,185,186} Deficiency also increases neuronal apoptosis and homocysteinylolation of proteins involved in neurodegeneration, including the Tau protein.¹⁸⁷ Unlike neurological manifestations, ophthalmological manifestations

Figure 2. Influence of age in the manifestations reported by the Cochran-Armitage test for trend in the three age categories, “0 to 1 year,” “1 to 14 years,” and “over 15 years”

(A) Neuropsychiatric manifestations include hypotony, abnormal EEG findings, seizures, peripheral neuropathy, extrapyramidal syndrome, pyramidal syndrome, walking difficulty, and cerebral atrophy reported on head MRI.

(B) Ophthalmological manifestations include nystagmus and strabismus.

(C) Cardiovascular and renal manifestations include thrombosis, blood pressure, and chronic kidney disease.

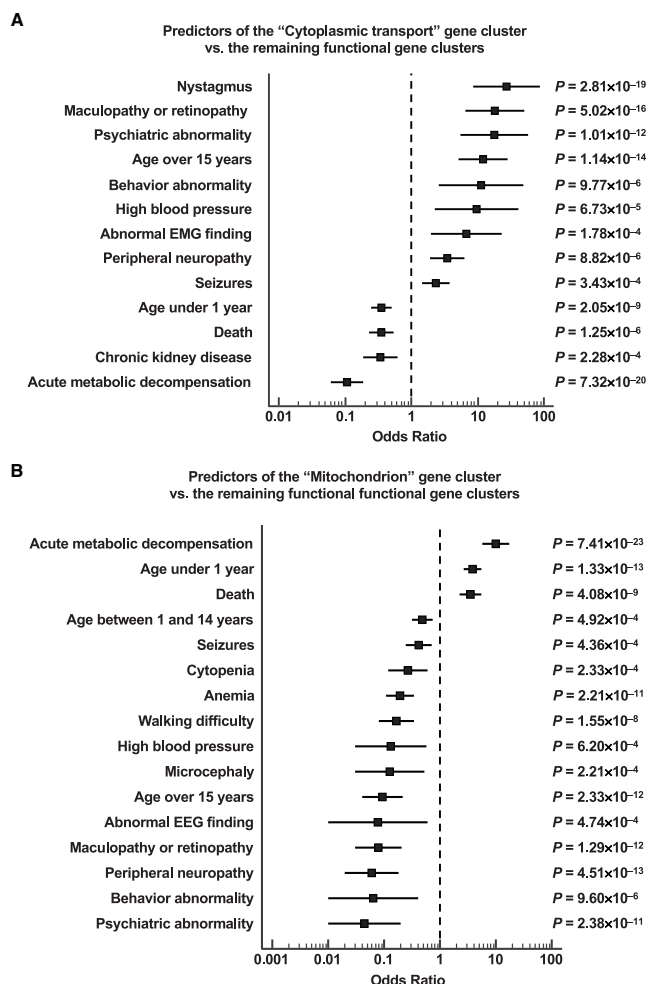


Figure 3. Predictors of inherited disorders of vitamin B12 metabolism according to "Cytoplasmic transport" and "Mitochondrion" functional gene clusters

(A) Forest plot illustrating the logistic regression analysis results that assessed the predictors of the "cytoplasmic transport" gene cluster compared with the remaining functional gene clusters. Only binary variables are shown in the Forest plot. The gene cluster "cytoplasmic transport" regroups all patients with *MMACHC* variants and *MMADHC* variants responsible for combined mitochondrion and remethylation abnormalities. The black square represents the OR and the horizontal line indicates the 95% CI.

(B) Forest plot illustrating the results of the logistic regression analysis that assessed the predictors of the "mitochondrion" gene cluster in comparison with the remaining functional gene clusters. Only binary variables are shown in the Forest plot. The gene cluster "mitochondrion" regroups all patients with *MMAA*, *MMAB*, or *MUT* variants and *MMADHC* variants responsible for mitochondrion abnormalities. OR, odds ratio; EMG, electromyography; EEG, electroencephalography. The black square represents the OR and the horizontal line indicates the 95% CI.

are mainly observed in patients whose diagnosis is made in the first year of life.^{188,189} Like the neurological manifestations, they are mainly observed in combined deficits produced by altered intracellular metabolism of B₁₂ or bioavailability but not in the mitochondrial cluster of methylmalonyl-CoA catabolism, suggesting that the underlying pathomechanisms are presumably the consequence of the impaired remethylation pathway.

Cardiovascular manifestations, such as thromboembolic disorders, cardiomyopathy, and hypertension, accounted for the main clinical characteristics of cases over 15 years. They were underestimated in previous reviews and registries, which evaluated mostly

cases reported in pediatrics (Table 4).^{174,175} The thromboembolic manifestations were infrequent in the first year of life and were strongly associated with age (Figure 2). They may be related to the dramatic increase of homocysteine. The negative results of interventional studies to lower homocysteine in cases with mild hyperhomocysteinemia (<30 μmol/L) have confused the debate regarding the management of patients with intermediate to severe hyperhomocysteinemia.¹⁹⁰ In contrast, the association between vitamin B₁₂ and thromboembolic events was recently highlighted in a study of patients with hyperhomocysteinemia >30 μmol/L hospitalized for thromboembolic and other cardiovascular manifestations among 1,006 patients consecutively recruited in a regional university hospital center.¹⁹¹ Hyperhomocysteinemia was related to vitamin B₁₂ deficiency in 40% and mutations in one or more genes of vitamin B₁₂ metabolism in 11% of studied patients.¹⁹¹ The increase in systolic blood pressure was also closely associated with age (Figure 2). It was not explained by chronic renal failure, as the latter was not associated with age. The link between systolic blood pressure and homocysteine level has been well documented in interventional studies targeting MTHFR by riboflavin supplementation.^{192,193} In contrast, increased systolic blood pressure is not reported in the literature on inborn errors of vitamin B₁₂, probably because the published series of cases are focused on newborns and children.¹⁸⁵ The age-related increase



of blood pressure is consistent with experimental data in rats, in which vitamin B₁₂ and folate deficiency during pregnancy produced hypertension, arterial remodeling, and cardiomyopathy through homocysteinylation of extracellular matrix proteins and altered angiotensin-AT2 and TGFβ1 pathways in pups.^{194–197}

Acute metabolic decompensations were observed not only in the first year of life but also later with an associated risk of death. These results illustrate the need for the careful monitoring of patients in adulthood. Our data point out also the predominance of acute metabolic decompensation and death in the mitochondrion functional gene cluster (Table S6, related to Tables 1–4). This illustrates the dramatic consequences of the impaired adenosylcobalamin-dependent methylmalonyl-CoA conversion into propionyl-CoA. This reaction is the last step of a crucial anaplerotic pathway, which fuels the metabolites resulting from the catabolism of branched-chain amino acids, odd-chain fatty acids, and the side chain of cholesterol into the tricarboxylic acid cycle.¹⁹⁸ The frequent occurrence of decompensation and death among patients classified in the mitochondrion cluster is also found in Mut knockout (KO) mice, where most homozygous pups do not survive after 24 h of life.^{199,200} A hemizygous knockin (KI) mouse model (Mut-KO/KI), which combines a KI missense mutation with a KO allele, produces failure to thrive and kidney dysfunction, consistent with the mild phenotype observed in adult patients.²⁰¹ Adding a 51% protein diet produced a more severe phenotype with behavioral, cardiovascular, and hematological abnormalities, suggesting the influence of diet, particularly on adult cases.²⁰²

The diagnosis at an age older than 15 years concerned 18% of all cases with *MMACHC* mutations and could be related in part to the lower pathogenicity of genetic variants (Table S2, related to Tables 1–4). Among the ten most frequent associated genetic variants, seven were annotated as pathogenic and produced a truncated protein with presumed dramatic consequences on the intracellular transport and processing of vitamin B₁₂. Consistently, these mutations were predominantly reported in newborns (Table S2, related to Tables 1–4). In contrast, most cases diagnosed at an age older than 15 years had either the p.Arg161Gln frequent missense pathogenic mutation or missense mutations classified as likely pathogenic. Similarly, the patients of the mitochondrion cluster older than 15 years had genetic variants classified as likely pathogenic or of uncertain significance in *MMUT*, *MMAA*, and *MMAB* genes (Table S3–S5, related to Tables 1–4).

In our opinion, some key results of our study should be translated into clinical practice. We showed that neurological manifestations, such as hypotonia, EEG abnormalities, microcephaly, nystagmus, and strabismus, could evoke an inherited disease of vitamin B₁₂ metabolism even in the absence of anemia in pediatric practice. In contrast, walking difficulty, peripheral neuropathy, extrapyramidal syndrome, depression, and cerebral atrophy are much more frequent in patients over age 15 years. These patients are cared for by neurologists and internists who must be aware of the diagnosis of inherited disease of vitamin B₁₂ metabolism. Our results also show that cardiovascular manifestations are dramatically more frequent in adults than in children presenting with inherited disorders of vitamin B₁₂ metabolism. The association of increased systolic blood pressure with age is a heretofore unrecognized manifestation in this group of in-

herited metabolic diseases. The thromboembolic manifestations observed in the absence of classic risk factors of thrombophilia should lead to a search for hyperhomocysteinemia in association with an inherited error of vitamin B₁₂ metabolism, as was shown very recently in an observational study.¹⁹¹ These rare diseases may be underestimated or even ignored in the usual practice of cardiovascular medicine. US and European Societies of Cardiology do not recommend including hyperhomocysteinemia as a risk factor of cardiovascular disease. Consequently, cardiologists lack consideration and/or knowledge to diagnose and treat patients with intermediate and severe hyperhomocysteinemia related to an inherited error of vitamin B₁₂ metabolism. The neurological and cardiovascular clinical profiles should prompt clinicians to systematically check the metabolic markers of vitamin B₁₂ status, including homocysteine and methylmalonic acid, when the usual causes of these manifestations are discarded. Genetic analyses could be integrated into the diagnostic workup of these patients, particularly among those with extreme clinical phenotypes and/or a familial clustering. In this setting, clinical-exome sequencing-based approaches could be used as a straightforward first-tier diagnostic strategy in patients for whom a diagnosis of inherited disorders of vitamin B₁₂ metabolism is suspected.²⁰³ Identifying an underlying genetic error of vitamin B₁₂ metabolism could allow a personalized therapeutic approach to achieve partial or total restoration of metabolic alterations with potential long-term benefits.¹⁹¹

The present meta-analysis has several strengths. First, we report an individual patient data meta-analysis that collected original data from 824 patients to assess the phenotypic landscape of patients with inherited disorders of vitamin B₁₂ metabolism and to look for clinical, biological, imaging, and electrophysiological predictors significantly associated with age category, functional gene clusters, and death. The report of 74 adults, 133 children, and 509 newborns allowed us to assess the course and specificity of the manifestations according to age. By comparison, the most extensive registry study involved 248 patients seen primarily in pediatric departments.¹⁷⁵ Second, the reported data covered the 15 genes known to be involved in hereditary disorders of vitamin B₁₂ metabolism, allowing to perform updated annotation and pathogenicity prediction on more than 300 genetic variants reported on the four most frequently observed genes (*MMACHC*, *MMUT*, *MMAA*, and *MMAB*). In contrast, the largest registry study of the literature reported only on patients with *cbIC*, *cbIG*, *cbIE*, *cbID*, and *cbIJ* diseases.¹⁷⁵ Third, the meta-analysis of individually reported cases allowed the compilation of unselected patients, thereby reducing the risk of population heterogeneity. We did not consider studies of registries and case series with aggregated data to avoid any bias related to the study designs. This approach allowed us to consider manifestations that were not reported in registries, including nystagmus, maculopathy, retinopathy, peripheral neuropathy, walking difficulty, pyramidal syndrome, extrapyramidal syndrome, and cerebral atrophy reported on MRI.

We acknowledge several limitations. First, we used data extracted from available case reports through a systematic retrospective search, with the risk of missing data. For example, laboratory findings were not available for all patients. Second, the low number of case reports of inherited disorders of vitamin



B₁₂ absorption did not allow to evaluate whether they presented a clinical profile distinct from the other disorders of the B₁₂ availability cluster. The number of cases was lower than expected in regard to a recent study of our reference center for rare metabolic diseases, which showed mutations in *GIF*, *AMN*, and *CUBN* genes as the leading causes of hyperhomocysteinemia due to vitamin B₁₂ deficiency.¹⁹¹ Moreover, the diagnosis of Imlerslund-Gräsbeck disease is probably underestimated since the Schilling test is no longer available. Likewise, the determination of the soluble intrinsic factor receptor in the urine has limited use despite its diagnostic value in the different subsets of the disease.^{204–206} Third, we reported the single literature case with *ZNF143* mutation but not cases with mutations in *HCFC1*, *THAP11*, and *PRDX1*. These genes are not directly involved in vitamin B₁₂ metabolism and their mutations produce manifestations related to altered expression of *MMACHC* and/or other genes. *HCFC1* is a transcriptional co-regulator that interacts with *THAP11* and *ZNF143* DNA-binding proteins to jointly regulate the expression of target genes that include *MMACHC*.^{207–209} The *HCFC1/THAP11* complex also acts as a transcriptional regulator of ribosome biogenesis during development.²¹⁰ Mutations in any of the two genes produce decreased *MMACHC* expression with milder metabolic and more severe neurological manifestations than *MMACHC* mutations. Some mutations can also result in complex syndromes exhibiting aspects of both *cbfC* disease and ribosomopathies. In addition, some variants in *HCFC1* produce X-linked intellectual disability even in the absence of metabolic abnormalities of inherited disorders of vitamin B₁₂ metabolism. The single case in the literature of two mutations in the *ZNF143* gene had combined methylmalonic acidemia and hyperhomocysteinemia and bilateral cleft palate, microcephaly, severe neurological manifestations, and a ventricular septal defect.²⁰⁹ *PRDX1* is a gene neighboring *MMACHC*. Mutations in *PRDX1* produce the epi-*cbfC* type of inherited disorders of vitamin B₁₂ metabolism.¹⁴⁷ This disorder is due to an epimutation at the *MMACHC* promoter, which results from *PRDX1* splicing mutations with an aberrant extension of antisense transcription through the *MMACHC* promoter.¹⁴⁷ The antisense readthrough transcripts also encompass the promoter of the *TESK2* neighboring gene, resulting in the silencing of both *MMACHC* and *TESK2* genes.²¹¹ So far, 20 cases have been reported, with a much higher frequency of severe metabolic decompensation than in patients with *MMACHC* mutations.²¹² The fourth limit of our systematic review is the exclusion of case reports not written in English, which could have potentially led to selection bias. However, a previous study that examined non-English publications' influence on combined estimates of published meta-analyses did not reveal a significant effect after excluding non-English publications.²¹³ Fifth, we did not use machine learning and natural language processing methods that could represent attractive tools to decrease the manual burden during the literature collection and review process. However, these methods are limited by their potential bias toward a low detection rate.²¹⁴ Furthermore, machine learning methods did not apply to some old publications without a digital format that were included in our systematic review.

In conclusion, our meta-analysis and phenome-wide association study of the clinical, phenotypic, and genetic landscape of

824 patients with a genetically proven diagnosis of an inherited disorder of vitamin B₁₂ metabolism pointed out inborn errors of vitamin B₁₂ metabolism as potential etiologies deserving consideration in the diagnostic algorithm of atypical neurological manifestations and thromboembolic disorders not explained by classical etiologies in children and adult cases. We highlighted a high frequency of inherited disorders of vitamin B₁₂ metabolism in patients older than 15 years. Compared with younger cases, adults harbored fewer pathogenic mutations and had a higher prevalence of cardiovascular manifestations, including thromboembolic outcomes and increased blood pressure. Neurological manifestations were also strongly dependent on age, with a predominance in gene clusters that impair the remethylation pathway. In contrast, metabolic decompensation and death were predominant in clusters that impair the adenosylcobalamin-dependent methylmalonyl-CoA conversion into propionyl-CoA, regardless of age.

Limitations of the study

This systematic review has several limitations: (1) we used data extracted from available case reports through a systematic retrospective search, with the risk of missing data; (2) we did not use machine learning and natural language processing methods that could represent attractive tools to decrease the manual burden during the literature collection and review process; (3) the low number of case reports of inherited disorders of vitamin B₁₂ absorption did not allow to evaluate whether they presented a clinical profile distinct from the other disorders of the “B₁₂ availability” cluster; (4) we excluded non-English case reports, which could have potentially led to selection bias.

STAR★METHODS

Detailed methods are provided in the online version of this paper and include the following:

- KEY RESOURCES TABLE
- RESOURCE AVAILABILITY
 - Lead contact
 - Materials availability
 - Data and code availability
- EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS
- METHOD DETAILS
 - Study aims
 - Electronic search query
 - Study selection
 - Data extraction
 - Main outcomes and measures
 - Functional gene clusters
- QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental information can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2022.100670>.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank David Rosenblatt for his careful reading of the manuscript and helpful advice. The icons used in the graphical abstract were made by Freepik from www.flaticon.com. Grants were received by FHU ARRIMAGE and the French GEENAGE project (Functional Genomic, Epigenomic and ENvironment interplay to IMPACT the Understanding, diagnosis and management of healthy and pathological Aging) of "Lorraine Université d'Excellence," reference ANR-15-IDEX-04-LUE and the OMAGE project granted by Region Grand-Est of France and FEDER.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Literature review and data extraction, A.W., A.O., N.L., M.T., M.J., J.-P.M., B.A., P.D., T.A., and M.F.; data synthesis, A.W.; drafting/revision of the manuscript, A.W., A.O., F.F., and J.-L.G.; analysis and interpretation of data, A.W., A.O., F.F., and J.-L.G.; data synthesis and statistical analysis, A.O.; study concept, J.-L.G.; literature review, A.W.; all authors approved the final draft.

DECLARATION OF INTERESTS

The authors declare no competing interests.

Received: June 14, 2021

Revised: November 22, 2021

Accepted: June 2, 2022

Published: June 27, 2022; corrected online: July 11, 2022

REFERENCES

- Gulati, S., Baker, P., Li, Y.N., Fowler, B., Kruger, W., Brody, L.C., and Banerjee, R. (1996). Defects in human methionine synthase in cblG patients. *Hum. Mol. Genet.* 5, 1859–1865. <https://doi.org/10.1093/hmg/5.12.1859>.
- Adjalla, C.E., Hosack, A.R., Gilfix, B.M., Lamothe, E., Sun, S., Chan, A., Evans, S., Matiaszuk, N.V., and Rosenblatt, D.S. (1998). Seven novel mutations in mut methylmalonic aciduria. *Hum. Mutat.* 11, 270–274. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1098-1004\(1998\)11:4<270::aid-humu3>3.0.co;2-t](https://doi.org/10.1002/(sici)1098-1004(1998)11:4<270::aid-humu3>3.0.co;2-t).
- Fuchshuber, A., Mucha, B., Baumgartner, E.R., Vollmer, M., and Hildebrandt, F. (2000). mut0 methylmalonic acidemia: eleven novel mutations of the methylmalonyl CoA mutase including a deletion-insertion mutation. *Hum. Mutat.* 16, 179. [https://doi.org/10.1002/1098-1004\(200008\)16:2<179::aid-humu17>3.0.co;2-r](https://doi.org/10.1002/1098-1004(200008)16:2<179::aid-humu17>3.0.co;2-r).
- Berger, I., Shaag, A., Anikster, Y., Baumgartner, E.R., Bar-Meir, M., Joseph, A., and Elpeleg, O.N. (2001). Mutation analysis of the MCM gene in Israeli patients with mut(0) disease. *Mol. Genet. Metabol.* 73, 107–110. <https://doi.org/10.1006/mgme.2001.3166>.
- Dobson, C.M., Wai, T., Leclerc, D., Wilson, A., Wu, X., Doré, C., Hudson, T., Rosenblatt, D.S., and Gravel, R.A. (2002). Identification of the gene responsible for the cblA complementation group of vitamin B12-responsive methylmalonic acidemia based on analysis of prokaryotic gene arrangements. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 15554–15559. <https://doi.org/10.1073/pnas.242614799>.
- Peters, H.L., Nefedov, M., Lee, L.W., Abdenur, J.E., Chamoles, N.A., Kahler, S.G., and Ioannou, P.A. (2002). Molecular studies in mutase-deficient (MUT) methylmalonic aciduria: identification of five novel mutations. *Hum. Mutat.* 20, 406. <https://doi.org/10.1002/humu.9074>.
- Qian, L., Quadros, E.V., Regec, A., Zittoun, J., and Rothenberg, S.P. (2002). Congenital transcobalamin II deficiency due to errors in RNA editing. *Blood Cells Mol. Dis.* 28, 134–142, discussion 143–135. <https://doi.org/10.1006/bcmd.2002.0499>.
- Zavad'áková, P., Fowler, B., Zeman, J., Suormala, T., Pšístouplíková, K., Kožich, V., and Zavad'áková, P. (2002). CblE type of homocystinuria due to methionine synthase reductase deficiency: clinical and molecular studies and prenatal diagnosis in two families. *J. Inher. Metab. Dis.* 25, 461–476. <https://doi.org/10.1023/a:1021299117308>.
- Champattanachai, V., Ketudat Cairns, J.R., Shotelersuk, V., Keerati-chamroen, S., Sawangaretrakul, P., Srissomsap, C., Kaewpaluek, V., and Svasti, J. (2003). Novel mutations in a Thai patient with methylmalonic acidemia. *Mol. Genet. Metabol.* 79, 300–302. [https://doi.org/10.1016/s1096-7192\(03\)00106-9](https://doi.org/10.1016/s1096-7192(03)00106-9).
- Teplitsky, V., Huminer, D., Zoldan, J., Pitlik, S., Shohat, M., and Mittelman, M. (2003). Hereditary partial transcobalamin II deficiency with neurologic, mental and hematologic abnormalities in children and adults. *Isr. Med. Assoc. J.* 5, 868–872.
- Vilaseca, M.A., Vilarinho, L., Zavadakova, P., Vela, E., Cieto, E., Pineda, M., Coimbra, E., Suormala, T., Fowler, B., and Kozich, V. (2003). CblE type of homocystinuria: mild clinical phenotype in two patients homozygous for a novel mutation in the MTRR gene. *J. Inher. Metab. Dis.* 26, 361–369. <https://doi.org/10.1023/a:1025159103257>.
- Suormala, T., Baumgartner, M.R., Coelho, D., Zavadakova, P., Kozich, V., Koch, H.G., Berghäuser, M., Wraith, J.E., Burlina, A., Sewell, A., et al. (2004). The cblD defect causes either isolated or combined deficiency of methylcobalamin and adenosylcobalamin synthesis. *J. Biol. Chem.* 279, 42742–42749. <https://doi.org/10.1074/jbc.M407733200>.
- Guignon, V., Frémeaux-Bacchi, V., Giraudier, S., Favier, R., Borderie, D., Massy, Z., Mougnot, B., Rosenblatt, D.S., and Deschênes, G. (2005). Late-onset thrombotic microangiopathy caused by cblC disease: association with a factor H mutation. *Am. J. Kidney Dis.* 45, 588–595. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2004.12.004>.
- Jung, J.W., Hwang, I.T., Park, J.E., Lee, E.H., Ryu, K.H., Kim, S.H., and Hwang, J.S. (2005). Mutation analysis of the MCM gene in Korean patients with MMA. *Mol. Genet. Metabol.* 84, 367–370. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2004.11.002>.
- Ostergaard, E., Wibrand, F., Orngreen, M.C., Vissing, J., and Horn, N. (2005). Impaired energy metabolism and abnormal muscle histology in mut- methylmalonic aciduria. *Neurology* 65, 931–933. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000176065.80560.26>.
- Poloschek, C.M., Fowler, B., Unsold, R., and Lorenz, B. (2005). Disturbed visual system function in methionine synthase deficiency. *Albrecht Von Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 243, 497–500. <https://doi.org/10.1007/s00417-004-1044-2>.
- Zavad'áková, P., Fowler, B., Suormala, T., Novotna, Z., Mueller, P., Hennenmann, J.B., Zeman, J., Vilaseca, M.A., Vilarinho, L., Gutsche, S., et al. (2005). cblE type of homocystinuria due to methionine synthase reductase deficiency: functional correction by minigene expression. *Hum. Mutat.* 25, 239–247. <https://doi.org/10.1002/humu.20131>.
- Coman, D., Huang, J., McTaggart, S., Sakamoto, O., Ohura, T., McGill, J., and Burke, J. (2006). Renal transplantation in a 14-year-old girl with vitamin B12-responsive cblA-type methylmalonic acidemia. *Pediatr. Nephrol.* 21, 270–273. <https://doi.org/10.1007/s00467-005-2071-x>.
- Kaplan, P., Ficioglu, C., Mazur, A.T., Palmieri, M.J., and Berry, G.T. (2006). Liver transplantation is not curative for methylmalonic acidopathy caused by methylmalonyl-CoA mutase deficiency. *Mol. Genet. Metabol.* 88, 322–326. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2006.04.003>.
- Morel, C.F., Lerner-Ellis, J.P., and Rosenblatt, D.S. (2006). Combined methylmalonic aciduria and homocystinuria (cblC): phenotype-genotype correlations and ethnic-specific observations. *Mol. Genet. Metabol.* 88, 315–321. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2006.04.001>.
- Ben-Omran, T.I., Wong, H., Blaser, S., and Feigenbaum, A. (2007). Late-onset cobalamin-C disorder: a challenging diagnosis. *Am. J. Med. Genet.* 143a, 979–984. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.31671>.
- Heil, S.G., Hogeveen, M., Kluijtmans, L.A.J., van Dijken, P.J., van de Berg, G.B., Blom, H.J., and Morava, E. (2007). Marfanoid features in a child with combined methylmalonic aciduria and homocystinuria (CblC type). *J. Inher. Metab. Dis.* 30, 811. <https://doi.org/10.1007/s10545-007-0546-6>.



23. Hörster, F., Baumgartner, M.R., Viardot, C., Suormala, T., Burgard, P., Fowler, B., Hoffmann, G.F., Garbade, S.F., Kölker, S., and Baumgartner, E.R. (2007). Long-term outcome in methylmalonic acidurias is influenced by the underlying defect (mut0, mut-cblA, cblB). *Pediatr. Res.* 62, 225–230. <https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e3180a0325f>.
24. Keeratchamroen, S., Cairns, J.R.K., Sawangareetrakul, P., Liammongkolkul, S., Champattanachai, V., Srisomsap, C., Kamolsilp, M., Wasant, P., and Svasti, J. (2007). Novel mutations found in two genes of Thai patients with isolated methylmalonic acidemia. *Biochem. Genet.* 45, 421–430. <https://doi.org/10.1007/s10528-007-9085-y>.
25. Oyama, C., Takahashi, T., Matsumori, M., Shoji, Y., Tajima, G., Sakura, N., Hasegawa, Y., Yamaguchi, S., Kakinuma, H., and Takada, G. (2007). Novel mutation of methylmalonyl-CoA mutase gene causing the mut0 form of methylmalonic acidemia in a Japanese girl. *Pediatr. Int.* 49, 232–234. <https://doi.org/10.1111/j.1442-200X.2007.02325.x>.
26. Sharma, A.P., Greenberg, C.R., Prasad, A.N., and Prasad, C. (2007). Hemolytic uremic syndrome (HUS) secondary to cobalamin C (cblC) disorder. *Pediatr. Nephrol.* 22, 2097–2103. <https://doi.org/10.1007/s00467-007-0604-1>.
27. Tsai, A.C.H., Morel, C.F., Schärer, G., Yang, M., Lerner-Ellis, J.P., Rosenblatt, D.S., and Thomas, J.A. (2007). Late-onset combined homocystinuria and methylmalonic aciduria (cblC) and neuropsychiatric disturbance. *Am. J. Med. Genet.* 143a, 2430–2434. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.31932>.
28. Coelho, D., Suormala, T., Stucki, M., Lerner-Ellis, J.P., Rosenblatt, D.S., Newbold, R.F., Baumgartner, M.R., and Fowler, B. (2008). Gene identification for the cblD defect of vitamin B12 metabolism. *N. Engl. J. Med.* 358, 1454–1464. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa072200>.
29. Gerth, C., Morel, C.F., Feigenbaum, A., and Levin, A.V. (2008). Ocular phenotype in patients with methylmalonic aciduria and homocystinuria, cobalamin C type. *J. Am. Assoc. Pediatr. Ophthalmol. Strabismus* 12, 591–596. <https://doi.org/10.1016/j.jaapos.2008.06.008>.
30. Hauck, F.H., Tanner, S.M., Henker, J., and Laass, M.W. (2008). Imlerslund-Gräsbeck syndrome in a 15-year-old German girl caused by compound heterozygous mutations in CUBN. *Eur. J. Pediatr.* 167, 671–675. <https://doi.org/10.1007/s00431-007-0571-3>.
31. Merinero, B., Pérez, B., Pérez-Cerdá, C., Rincón, A., Desviat, L.R., Martínez, M.A., Sala, P.R., García, M.J., Aldamiz-Echevarría, L., Campos, J., et al. (2008). Methylmalonic acidemia: examination of genotype and biochemical data in 32 patients belonging to mut, cblA or cblB complementation group. *J. Inherit. Metab. Dis.* 31, 55–66. <https://doi.org/10.1007/s10545-007-0667-y>.
32. Nogueira, C., Aiello, C., Cerone, R., Martins, E., Caruso, U., Moroni, I., Rizzo, C., Diogo, L., Leão, E., Kok, F., et al. (2008). Spectrum of MMACHC mutations in Italian and Portuguese patients with combined methylmalonic aciduria and homocystinuria, cblC type. *Mol. Genet. Metabol.* 93, 475–480. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2007.11.005>.
33. Prasad, C., Rosenblatt, D.S., Corley, K., Cairney, A.E.L., and Rupar, C.A. (2008). Transcobalamin (TC) deficiency—potential cause of bone marrow failure in childhood. *J. Inherit. Metab. Dis.* 31, S287–S292. <https://doi.org/10.1007/s10545-008-0864-3>.
34. Thauvin-Robinet, C., Roze, E., Couvreur, G., Horellou, M.H., Sedel, F., Grabli, D., Bruneteau, G., Tonnetti, C., Masurel-Paulet, A., Perennou, D., et al. (2007). The adolescent and adult form of cobalamin C disease: clinical and molecular spectrum. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.* 79, 725–728. <https://doi.org/10.1136/jnnp.2007.133025>.
35. Carrillo-Carrasco, N., Sloan, J., Valle, D., Hamosh, A., and Venditti, C.P. (2009). Hydroxocobalamin dose escalation improves metabolic control in cblC. *J. Inherit. Metab. Dis.* 32, 728–731. <https://doi.org/10.1007/s10545-009-1257-y>.
36. Cosson, M.A., Benoist, J.F., Touati, G., Déchaux, M., Royer, N., Grandin, L., Jais, J.P., Boddart, N., Barbier, V., Desguerre, I., et al. (2009). Long-term outcome in methylmalonic aciduria: a series of 30 French patients. *Mol. Genet. Metabol.* 97, 172–178. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2009.03.006>.
37. De Bie, I., Nizard, S.D.P., and Mitchell, G.A. (2009). Fetal dilated cardiomyopathy: an unsuspected presentation of methylmalonic aciduria and hyperhomocystinuria, cblC type. *Prenat. Diagn.* 29, 266–270. <https://doi.org/10.1002/pd.2218>.
38. Froese, D.S., Zhang, J., Healy, S., and Gravel, R.A. (2009). Mechanism of vitamin B12-responsiveness in cblC methylmalonic aciduria with homocystinuria. *Mol. Genet. Metabol.* 98, 338–343. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2009.07.014>.
39. Lin, H.J., Neidich, J.A., Salazar, D., Thomas-Johnson, E., Ferreira, B.F., Kwong, A.M., Lin, A.M., Jonas, A.J., Levine, S., Lorey, F., and Rosenblatt, D.S. (2009). Asymptomatic maternal combined homocystinuria and methylmalonic aciduria (cblC) detected through low carnitine levels on newborn screening. *J. Pediatr.* 155, 924–927. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2009.06.046>.
40. Miousse, I.R., Watkins, D., Coelho, D., Rupar, T., Crombez, E.A., Vilain, E., Bernstein, J.A., Cowan, T., Lee-Messer, C., Enns, G.M., et al. (2009). Clinical and molecular heterogeneity in patients with the cblD inborn error of cobalamin metabolism. *J. Pediatr.* 154, 551–556. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2008.10.043>.
41. Profitlich, L.E., Kirmse, B., Wasserstein, M.P., Diaz, G.A., and Srivastava, S. (2009). High prevalence of structural heart disease in children with cblC-type methylmalonic aciduria and homocystinuria. *Mol. Genet. Metabol.* 98, 344–348. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2009.07.017>.
42. Rutsch, F., Gailus, S., Miousse, I.R., Suormala, T., Sagné, C., Toliat, M.R., Nürnberg, G., Wittkamp, T., Buers, I., Sharifi, A., et al. (2009). Identification of a putative lysosomal cobalamin exporter altered in the cblF defect of vitamin B12 metabolism. *Nat. Genet.* 41, 234–239. <https://doi.org/10.1038/ng.294>.
43. Brunel-Guitton, C., Costa, T., Mitchell, G.A., and Lambert, M. (2010). Treatment of cobalamin C (cblC) deficiency during pregnancy. *J. Inherit. Metab. Dis.* 33, S409–S412. <https://doi.org/10.1007/s10545-010-9202-7>.
44. Campeau, P.M., Valayannopoulos, V., Touati, G., Bahi-Buisson, N., Boddart, N., Plouin, P., Rabier, D., Benoist, J.F., Dulac, O., de Lonlay, P., and Desguerre, I. (2010). Management of West syndrome in a patient with methylmalonic aciduria. *J. Child Neurol.* 25, 94–97. <https://doi.org/10.1177/0883073809336119>.
45. Frattini, D., Fusco, C., Uchino, V., Tavazzi, B., and Della Giustina, E. (2010). Early onset methylmalonic aciduria and homocystinuria cblC type with demyelinating neuropathy. *Pediatr. Neurol.* 43, 135–138. <https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2010.04.007>.
46. Jorge-Finnigan, A., Aguado, C., Sánchez-Alcudia, R., Abia, D., Richard, E., Merinero, B., Gámez, A., Banerjee, R., Desviat, L.R., Ugarte, M., and Pérez, B. (2010). Functional and structural analysis of five mutations identified in methylmalonic aciduria cblB type. *Hum. Mutat.* 31, 1033–1042. <https://doi.org/10.1002/humu.21307>.
47. Quadros, E.V., Lai, S.C., Nakayama, Y., Sequeira, J.M., Hannibal, L., Wang, S., Jacobsen, D.W., Fedosov, S., Wright, E., Gallagher, R.C., et al. (2010). Positive newborn screen for methylmalonic aciduria identifies the first mutation in TCblR/CD320, the gene for cellular uptake of transcobalamin-bound vitamin B(12). *Hum. Mutat.* 31, 924–929. <https://doi.org/10.1002/humu.21297>.
48. Chang, J.T., Chen, Y.Y., Liu, T.T., Liu, M.Y., and Chiu, P.C. (2011). Combined methylmalonic aciduria and homocystinuria cblC type of a Taiwanese infant with c.609G>A and C.567dupT mutations in the MMACHC gene. *Pediatr. Neonatol.* 52, 223–226. <https://doi.org/10.1016/j.pedneo.2011.05.006>.
49. Martinelli, D., Dotta, A., Massella, L., Picca, S., Di Pede, A., Boenzi, S., Aiello, C., and Dionisi-Vici, C. (2011). Cobalamin C defect presenting as severe neonatal hyperammonemia. *Eur. J. Pediatr.* 170, 887–890. <https://doi.org/10.1007/s00431-010-1371-8>.

50. Rutsch, F., Gailus, S., Suormala, T., and Fowler, B. (2011). LMBRD1: the gene for the cblF defect of vitamin B(1)(2) metabolism. *J. Inher. Metab. Dis.* 34, 121–126. <https://doi.org/10.1007/s10545-010-9083-9>.
51. Traber, G., Baumgartner, M.R., Schwarz, U., Pangalu, A., Donath, M.Y., and Landau, K. (2011). Subacute bilateral visual loss in methylmalonic acidemia. *J. Neuro Ophthalmol.* 31, 344–346. <https://doi.org/10.1097/WNO.0b013e31822db480>.
52. Yi, Q., Lv, J., Tian, F., Wei, H., Ning, Q., and Luo, X. (2011). Clinical characteristics and gene mutation analysis of methylmalonic aciduria. *J. Huazhong Univ. Sci. Technol. - Med. Sci.* 37, 384–389. <https://doi.org/10.1007/s11596-011-0386-3>.
53. Boina Abdallah, A., Ogier de Baulny, H., Kozyraki, R., Passemard, S., Fenneteau, O., Lebon, S., Rigal, O., Mesplès, B., Yacouben, K., Giraudier, S., et al. (2012). How can cobalamin injections be spaced in long-term therapy for inborn errors of vitamin B(12) absorption? *Mol. Genet. Metabol.* 107, 66–71. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2012.07.007>.
54. Coelho, D., Kim, J.C., Miousse, I.R., Fung, S., du Moulin, M., Buers, I., Suormala, T., Burda, P., Frapolli, M., Stucki, M., et al. (2012). Mutations in ABCD4 cause a new inborn error of vitamin B12 metabolism. *Nat. Genet.* 44, 1152–1155. <https://doi.org/10.1038/ng.2386>.
55. Guven, A., Cebeci, N., Dursun, A., Aktekin, E., Baumgartner, M., Fowler, B., Guven, A., and Dursun, A. (2012). Methylmalonic acidemia mimicking diabetic ketoacidosis in an infant. *Pediatr. Diabetes* 13, e22–25. <https://doi.org/10.1111/j.1399-5448.2011.00784.x>.
56. Kim, J.C., Lee, N.C., Hwu, P.W.L., Chien, Y.H., Fahiminiya, S., Majewski, J., Watkins, D., and Rosenblatt, D.S. (2012). Late onset of symptoms in an atypical patient with the cblJ inborn error of vitamin B12 metabolism: diagnosis and novel mutation revealed by exome sequencing. *Mol. Genet. Metabol.* 107, 664–668. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2012.10.005>.
57. Menni, F., Testa, S., Guez, S., Chiarelli, G., Alberti, L., and Esposito, S. (2012). Neonatal atypical hemolytic uremic syndrome due to methylmalonic aciduria and homocystinuria. *Pediatr. Nephrol.* 27, 1401–1405. <https://doi.org/10.1007/s00467-012-2152-6>.
58. Wang, X., Sun, W., Yang, Y., Jia, J., and Li, C. (2012). A clinical and gene analysis of late-onset combined methylmalonic aciduria and homocystinuria, cblC type, in China. *J. Neurol. Sci.* 318, 155–159. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2012.04.012>.
59. Armour, C.M., Brebner, A., Watkins, D., Geraghty, M.T., Chan, A., and Rosenblatt, D.S. (2013). A patient with an inborn error of vitamin B12 metabolism (cblF) detected by newborn screening. *Pediatrics* 132, e257–261. <https://doi.org/10.1542/peds.2013-0105>.
60. Backe, P.H., Ytre-Arne, M., Rohr, Å.K., Brodtkorb, E., Fowler, B., Rootwelt, H., Björås, M., and Mørkrid, L. (2013). Novel deletion mutation identified in a patient with late-onset combined methylmalonic acidemia and homocystinuria, cblC type. *JIMD Rep.* 11, 79–85. https://doi.org/10.1007/8904_2013_225.
61. Brassier, A., Boyer, O., Valayannopoulos, V., Ottolenghi, C., Krug, P., Cosson, M.A., Touati, G., Arnoux, J.B., Barbier, V., Bahi-Buisson, N., et al. (2013). Renal transplantation in 4 patients with methylmalonic aciduria: a cell therapy for metabolic disease. *Mol. Genet. Metabol.* 110, 106–110. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2013.05.001>.
62. De Filippo, G., Rendina, D., Rocco, V., Esposito, T., Gianfrancesco, F., and Strazzullo, P. (2013). Imerlund-Gräsbeck syndrome in a 25-month-old Italian girl caused by a homozygous mutation in AMN. *Ital. J. Pediatr.* 39, 58. <https://doi.org/10.1186/1824-7288-39-58>.
63. Haarmann, A., Mayr, M., Kölker, S., Baumgartner, E.R., Schnierda, J., Hopfer, H., Devuyt, O., and Baumgartner, M.R. (2013). Renal involvement in a patient with cobalamin A type (cblA) methylmalonic aciduria: a 42-year follow-up. *Mol. Genet. Metabol.* 110, 472–476. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2013.08.021>.
64. Illson, M.L., Dempsey-Nunez, L., Kent, J., Huang, Q., Brebner, A., Raff, M.L., Watkins, D., Gilfix, B.M., Wittwer, C.T., and Rosenblatt, D.S. (2013). High resolution melting analysis of the MMAB gene in cblB patients and in those with undiagnosed methylmalonic aciduria. *Mol. Genet. Metabol.* 110, 86–89. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2013.04.020>.
65. Imataka, G., Sakamoto, O., Yamanouchi, H., Yoshihara, S., Omura-Hasegawa, Y., Tajima, G., and Arisaka, O. (2013). Novel c.2216T > C (p.I739T) mutation in exon 13 and c.1481T > A (p.L494X) mutation in exon 8 of MUT gene in a female with methylmalonic acidemia. *Cell Biochem. Biophys.* 67, 185–187. <https://doi.org/10.1007/s12013-013-9532-9>.
66. Iodice, F.G., Di Chiara, L., Boenzi, S., Aiello, C., Monti, L., Cogo, P., and Dionisi-Vici, C. (2013). Cobalamin C defect presenting with isolated pulmonary hypertension. *Pediatrics* 132, e248–251. <https://doi.org/10.1542/peds.2012-1945>.
67. Lubrano, R., Bellelli, E., Gentile, I., Paoli, S., Carducci, C., Carducci, C., Santagata, S., Pérez, B., Ugarte, M., Labriola, D., and Elli, M. (2013). Pregnancy in a methylmalonic acidemia patient with kidney transplantation: a case report. *Am. J. Transplant.* 13, 1918–1922. <https://doi.org/10.1111/ajt.12282>.
68. Nizon, M., Ottolenghi, C., Valayannopoulos, V., Arnoux, J.B., Barbier, V., Habarou, F., Desguerre, I., Boddaert, N., Bonnefont, J.P., Acquaviva, C., et al. (2013). Long-term neurological outcome of a cohort of 80 patients with classical organic acidurias. *Orphanet J. Rare Dis.* 8, 148. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-8-148>.
69. Palanca, D., Garcia-Cazorla, A., Ortiz, J., Jou, C., Cusi, V., Suñol, M., Toll, T., Perez, B., Ormazabal, A., Fowler, B., and Artuch, R. (2013). cblE-type homocystinuria presenting with features of haemolytic-uremic syndrome in the newborn period. *JIMD reports* 8, 57–62. https://doi.org/10.1007/8904_2012_161.
70. Parini, R., Furlan, F., Brambilla, A., Codazzi, D., Vedovati, S., Corbetta, C., Fedeli, T., Merinero, B., Pérez, B., Ugarte, M., and BrAmbillA, A. (2013). Severe neonatal metabolic decompensation in methylmalonic acidemia caused by CblD defect. *JIMD Rep.* 11, 133–137. https://doi.org/10.1007/8904_2013_232.
71. Paul, E.A., Guttenberg, M., Kaplan, P., Watkins, D., Rosenblatt, D.S., Treat, J.R., and Kaplan, B.S. (2013). Atypical glomerulopathy associated with the cblE inborn error of vitamin B(1)(2) metabolism. *Pediatr. Nephrol.* 28, 1135–1139. <https://doi.org/10.1007/s00467-013-2443-6>.
72. Underhill, H.R., Hahn, S.H., Hale, S.L., and Merritt, J.L., 2nd. (2013). Asymptomatic methylmalonic acidemia in a homozygous MUT mutation (p.P86L). *Pediatr. Int.* 55, e156–158. <https://doi.org/10.1111/ped.12195>.
73. Weisfeld-Adams, J.D., Bender, H.A., Miley-Åkerstedt, A., Frempong, T., Schragar, N.L., Patel, K., Naidich, T.P., Stein, V., Spat, J., Towns, S., et al. (2013). Neurologic and neurodevelopmental phenotypes in young children with early-treated combined methylmalonic acidemia and homocystinuria, cobalamin C type. *Mol. Genet. Metabol.* 110, 241–247. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2013.07.018>.
74. Yu, H.C., Sloan, J.L., Scharer, G., Brebner, A., Quintana, A.M., Achilly, N.P., Manoli, I., Coughlin, C.R., 2nd, Geiger, E.A., Schneck, U., et al. (2013). An X-linked cobalamin disorder caused by mutations in transcriptional coregulator HCF1. *Am. J. Hum. Genet.* 93, 506–514. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2013.07.022>.
75. Agarwal, R., Feldman, G.L., Poulik, J., Stockton, D.W., and Sood, B.G. (2014). Methylmalonic acidemia presenting as persistent pulmonary hypertension of the newborn. *J. Neonatal Perinat. Med.* 7, 247–251. <https://doi.org/10.3233/npm-14814004>.
76. Atkinson, C., Miousse, I.R., Watkins, D., Rosenblatt, D.S., and Raiman, J.A.J. (2014). Clinical, biochemical, and molecular presentation in a patient with the cblD-homocystinuria inborn error of cobalamin metabolism. *JIMD reports* 17, 77–81. https://doi.org/10.1007/8904_2014_340.
77. Corneec-Le Gall, E., Delmas, Y., De Parscau, L., Doucet, L., Ogier, H., Benoit, J.F., Fremieux-Bacchi, V., and Le Meur, Y. (2014). Adult-onset eculizumab-resistant hemolytic uremic syndrome associated with cobalamin C deficiency. *Am. J. Kidney Dis.* 63, 119–123. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2013.08.031>.



78. Fischer, S., Huemer, M., Baumgartner, M., Deodato, F., Ballhausen, D., Boneh, A., Burlina, A.B., Cerone, R., Garcia, P., Gökçay, G., et al. (2014). Clinical presentation and outcome in a series of 88 patients with the *cbiC* defect. *J. Inher. Metab. Dis.* **37**, 831–840. <https://doi.org/10.1007/s10545-014-9687-6>.
79. Forny, P., Froese, D.S., Suormala, T., Yue, W.W., and Baumgartner, M.R. (2014). Functional characterization and categorization of missense mutations that cause methylmalonyl-CoA mutase (MUT) deficiency. *Hum. Mutat.* **35**, 1449–1458. <https://doi.org/10.1002/humu.22633>.
80. Gizicki, R., Robert, M.C., Gómez-López, L., Orquin, J., Decarie, J.C., Mitchell, G.A., Roy, M.S., and Ospina, L.H. (2014). Long-term visual outcome of methylmalonic aciduria and homocystinuria, cobalamin C type. *Ophthalmology* **121**, 381–386. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2013.08.034>.
81. Gündüz, M., Ekici, F., Özyayın, E., Ceylaner, S., and Perez, B. (2014). Reversible pulmonary arterial hypertension in cobalamin-dependent cobalamin C disease due to a novel mutation in the *MMACHC* gene. *Eur. J. Pediatr.* **173**, 1707–1710. <https://doi.org/10.1007/s00431-014-2330-6>.
82. Huemer, M., Scholl-Bürgi, S., Hadaya, K., Kern, I., Beer, R., Seppi, K., Fowler, B., Baumgartner, M.R., and Karall, D. (2014). Three new cases of late-onset *cbiC* defect and review of the literature illustrating when to consider inborn errors of metabolism beyond infancy. *Orphanet J. Rare Dis.* **9**, 161. <https://doi.org/10.1186/s13023-014-0161-1>.
83. Rahmandar, M.H., Bawcom, A., Romano, M.E., and Hamid, R. (2014). Cobalamin C deficiency in an adolescent with altered mental status and anorexia. *Pediatrics* **134**, e1709–1714. <https://doi.org/10.1542/peds.2013-2711>.
84. Unal, S., Tezol, O., and Oztas, Y. (2014). A novel mutation of the transcobalamin II gene in an infant presenting with hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Int. J. Hematol.* **99**, 659–662. <https://doi.org/10.1007/s12185-014-1545-7>.
85. Vernon, H.J., Sperati, C.J., King, J.D., Poretti, A., Miller, N.R., Sloan, J.L., Cameron, A.M., Myers, D., Venditti, C.P., and Valle, D. (2014). A detailed analysis of methylmalonic acid kinetics during hemodialysis and after combined liver/kidney transplantation in a patient with *mut* (0) methylmalonic acidemia. *J. Inher. Metab. Dis.* **37**, 899–907. <https://doi.org/10.1007/s10545-014-9730-7>.
86. Wang, R.Y., Chang, R.C., Sowa, M.E., Chang, A.C., and Abdenur, J.E. (2014). Prevention of metabolic decompensation in an infant with mutase deficient methylmalonic aciduria undergoing cardiopulmonary bypass. *World J. Clin. Pediatr.* **10**, 83–85. <https://doi.org/10.1007/s12519-014-0458-0>.
87. Ahrens-Nicklas, R.C., Serdaroglu, E., Muraresku, C., and Ficiocioglu, C. (2015). Cobalamin C disease missed by newborn screening in a patient with low carnitine level. *JIMD reports* **23**, 71–75. https://doi.org/10.1007/8904_2015_429.
88. Aleman, T.S., Brodie, F., Garvin, C., Gewaily, D.Y., Ficiocioglu, C.H., Mills, M.D., Forbes, B.J., Maguire, A.M., and Davidson, S.L. (2015). Retinal structure in cobalamin C disease: mechanistic and therapeutic implications. *Ophthalmic Genet.* **36**, 339–348. <https://doi.org/10.3109/13816810.2014.885059>.
89. Bonafede, L., Ficiocioglu, C.H., Serrano, L., Han, G., Morgan, J.J.W., Mills, M.D., Forbes, B.J., Davidson, S.L., Binenbaum, G., Kaplan, P.B., et al. (2015). Cobalamin C deficiency shows a rapidly progressing maculopathy with severe photoreceptor and ganglion cell loss. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **56**, 7875–7887. <https://doi.org/10.1167/iovs.15-17857>.
90. Brasil, S., Richard, E., Jorge-Finnigan, A., Leal, F., Merinero, B., Banerjee, R., Desviat, L.R., Ugarte, M., and Pérez, B. (2015). Methylmalonic aciduria *cbiB* type: characterization of two novel mutations and mitochondrial dysfunction studies. *Clin. Genet.* **87**, 576–581. <https://doi.org/10.1111/cge.12426>.
91. Collison, F.T., Xie, Y.A., Gambin, T., Jhangiani, S., Muzny, D., Gibbs, R., Lupski, J.R., Fishman, G.A., and Allikmets, R. (2015). Whole exome sequencing identifies an adult-onset case of methylmalonic aciduria and homocystinuria type C (*cbiC*) with non-syndromic bull's eye maculopathy. *Ophthalmic Genet.* **36**, 270–275. <https://doi.org/10.3109/13816810.2015.1010736>.
92. Ghoraba, D.A., Mohammed, M.M., and Zaki, O.K. (2015). Mutation analysis of methylmalonyl CoA mutase gene exon 2 in Egyptian families: identification of 25 novel allelic variants. *Meta Gene* **3**, 71–88. <https://doi.org/10.1016/j.mgene.2014.02.001>.
93. Han, L., Wu, S., Ye, J., Qiu, W., Zhang, H., Gao, X., Wang, Y., Gong, Z., Jin, J., and Gu, X. (2015). Biochemical, molecular and outcome analysis of eight Chinese asymptomatic individuals with methyl malonic acidemia detected through newborn screening. *Am. J. Med. Genet.* **167**, 2300–2305. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.37147>.
94. Han, L.S., Huang, Z., Han, F., Ye, J., Qiu, W.J., Zhang, H.W., Wang, Y., Gong, Z.W., and Gu, X.F. (2015). Clinical features and MUT gene mutation spectrum in Chinese patients with isolated methylmalonic acidemia: identification of ten novel allelic variants. *World J. Clin. Pediatr.* **11**, 358–365. <https://doi.org/10.1007/s12519-015-0043-1>.
95. Huemer, M., Bürer, C., Jesina, P., Kožich, V., Landolt, M.A., Suormala, T., Fowler, B., Augoustides-Savvopoulou, P., Blair, E., Brennerova, K., et al. (2015). Clinical onset and course, response to treatment and outcome in 24 patients with the *cbiE* or *cbiG* remethylation defect complemented by genetic and in vitro enzyme study data. *J. Inher. Metab. Dis.* **38**, 957–967. <https://doi.org/10.1007/s10545-014-9803-7>.
96. Koenig, J.C., Rutsch, F., Bockmeyer, C., Baumgartner, M., Beck, B.B., Kranz, B., and Konrad, M. (2015). Nephrotic syndrome and thrombotic microangiopathy caused by cobalamin C deficiency. *Pediatr. Nephrol.* **30**, 1203–1206. <https://doi.org/10.1007/s00467-015-3110-x>.
97. Krueger, J.M., Piantino, J., Smith, C.M., Angle, B., Venkatesan, C., and Wainwright, M.S. (2015). A treatable metabolic cause of encephalopathy: cobalamin C deficiency in an 8-year-old male. *Pediatrics* **135**, e202–206. <https://doi.org/10.1542/peds.2013-1427>.
98. Li, Q.L., Song, W.Q., Peng, X.X., Liu, X.R., He, L.J., and Fu, L.B. (2015). Clinical characteristics of hemolytic uremic syndrome secondary to cobalamin C disorder in Chinese children. *World J. Clin. Pediatr.* **11**, 276–280. <https://doi.org/10.1007/s12519-015-0032-4>.
99. Liu, Y., Wang, Q., Li, X., Ding, Y., Song, J., and Yang, Y. (2015). First Chinese case of successful pregnancy with combined methylmalonic aciduria and homocystinuria, *cbiC* type. *Brain Dev.* **37**, 286–291. <https://doi.org/10.1016/j.braindev.2014.06.007>.
100. Liu, Y.R., Ji, Y.F., Wang, Y.L., Zhang, B.A., Fang, G.Y., Wang, J.T., Sun, G.F., and Lu, H. (2015). Clinical analysis of late-onset methylmalonic acidemia and homocystinuria, *cbiC* type with a neuropsychiatric presentation. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.* **86**, 472–475. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2014-308203>.
101. Mohamed, S., Hamad, M.H., and Abu-Amero, K.K. (2015). Identification of 2 novel homozygous mutations in the methylmalonyl-CoA mutase gene in Saudi patients. *Saudi Med. J.* **36**, 1110–1114. <https://doi.org/10.15537/smj.2015.9.12118>.
102. Montgomery, E., Sayer, J.A., Baines, L.A., Hynes, A.M., Vega-Warner, V., Johnson, S., Goodship, J.A., and Otto, E.A. (2015). Novel compound heterozygous mutations in *AMN* cause Imerslund-Gräsbeck syndrome in two half-sisters: a case report. *BMC Med. Genet.* **16**, 35. <https://doi.org/10.1186/s12881-015-0181-2>.
103. Niemi, A.K., Kim, I.K., Krueger, C.E., Cowan, T.M., Baugh, N., Farrell, R., Bonham, C.A., Concepcion, W., Esquivel, C.O., and Enns, G.M. (2015). Treatment of methylmalonic acidemia by liver or combined liver-kidney transplantation. *J. Pediatr.* **166**, 1455–1461.e1. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2015.01.051>.
104. Paleja, A., and Udumudi, A. (2015). Prenatal identification of a novel mutation causing methylmalonic acidemia in a family without proband. *J. Genet.* **94**, 295–298. <https://doi.org/10.1007/s12041-015-0520-2>.
105. Raval, D.B., Merideth, M., Sloan, J.L., Braverman, N.E., Conway, R.L., Manoli, I., and Venditti, C.P. (2015). Methylmalonic acidemia (MMA) in

- pregnancy: a case series and literature review. *J. Inherit. Metab. Dis.* 38, 839–846. <https://doi.org/10.1007/s10545-014-9802-8>.
106. Sawangareetrakul, P., Ketudat Cairns, J.R., Vatanavicharn, N., Liam-mongkolkul, S., Wasant, P., Svasti, J., and Champattanachai, V. (2015). Analysis of novel mutations and methylmalonyl-CoA mutase levels in Thai patients with isolated methylmalonic acidemia. *Biochem. Genet.* 53, 310–318. <https://doi.org/10.1007/s10528-015-9694-9>.
 107. Shi, C., Shang, D., Sun, S., Mao, C., Qin, J., Luo, H., Shao, M., Chen, Z., Liu, Y., Liu, X., et al. (2015). MMACHC gene mutation in familial hypogonadism with neurological symptoms. *Gene* 574, 380–384. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.08.029>.
 108. Spada, M., Calvo, P.L., Brunati, A., Peruzzi, L., Dell'Olio, D., Romagnoli, R., and Porta, F. (2015). Early liver transplantation for neonatal-onset methylmalonic acidemia. *Pediatrics* 136, e252–256. <https://doi.org/10.1542/peds.2015-0175>.
 109. Takeichi, T., Hsu, C.K., Yang, H.S., Chen, H.Y., Wong, T.W., Tsai, W.L., Chao, S.C., Lee, J.Y., Akiyama, M., Simpson, M.A., and McGrath, J.A. (2015). Progressive hyperpigmentation in a Taiwanese child due to an inborn error of vitamin B12 metabolism (cblJ). *Br. J. Dermatol.* 172, 1111–1115. <https://doi.org/10.1111/bjd.13413>.
 110. Unal, S., Rupar, T., Yetgin, S., Yerali, N., Dursun, A., Gürsel, T., and Cetin, M. (2015). Transcobalamin II deficiency in four cases with novel mutations. *Turk. J. Haematol.* 32, 317–322. <https://doi.org/10.4274/tjh.2014.0154>.
 111. Wang, J., Li, E., Wang, L., Wang, Z., Yang, S., Zhou, Q., and Chen, Q. (2015). Genetic analysis of four cases of methylmalonic aciduria and homocystinuria, cblC type#. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 8, 9337–9341.
 112. Zong, Y., Liu, N., Zhao, Z., and Kong, X. (2015). Prenatal diagnosis using genetic sequencing and identification of a novel mutation in MMACHC. *BMC Med. Genet.* 16, 48. <https://doi.org/10.1186/s12881-015-0196-8>.
 113. Ahmadloo, S., Talebi, S., Miryounesi, M., Pasalar, P., and Keramatipour, M. (2016). Functional analysis of A novel splicing mutation in the mutase gene of two unrelated pedigrees. *Cell J.* 18, 397–404. <https://doi.org/10.22074/cellj.2016.4568>.
 114. Bellerose, J., Neugnot-Ceroli, M., Bédard, K., Brunel-Guitton, C., Mitchell, G.A., Ospina, L.H., and Beauchamp, M.H. (2016). A highly diverse portrait: heterogeneity of neuropsychological profiles in cblC defect. *JIMD Rep.* 29, 19–32. https://doi.org/10.1007/8904_2015_517.
 115. Brooks, B.P., Thompson, A.H., Sloan, J.L., Manoli, I., Carrillo-Carrasco, N., Zein, W.M., and Venditti, C.P. (2016). Ophthalmic manifestations and long-term visual outcomes in patients with cobalamin C deficiency. *Ophthalmology* 123, 571–582. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2015.10.041>.
 116. Charuvanij, S., Pattaragarn, A., Wisuthsarewong, W., and Vatanavicharn, N. (2016). Juvenile gout in methylmalonic acidemia. *Pediatr. Int.* 58, 501–503. <https://doi.org/10.1111/ped.12857>.
 117. Constantinou, P., D'Alessandro, M., Lochhead, P., Samant, S., Bisset, W.M., Hauptfleisch, C., and Dean, J. (2015). A new, atypical case of cobalamin F disorder diagnosed by whole exome sequencing. *Molecular Syndromol.* 6, 254–258. <https://doi.org/10.1159/000441134>.
 118. Deikhamron, P., Wejapikul, K., Unachak, K., Sawangareetrakul, P., Tanpaiboon, P., and Wattanasirichaigoon, D. (2016). Isolated methylmalonic acidemia with unusual presentation mimicking diabetic ketoacidosis. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* 29, 373–378. <https://doi.org/10.1515/jpem-2015-0228>.
 119. Forny, P., Schnellmann, A.S., Buerer, C., Lutz, S., Fowler, B., Froese, D.S., and Baumgartner, M.R. (2016). Molecular genetic characterization of 151 mut-type methylmalonic aciduria patients and identification of 41 novel mutations in MUT. *Hum. Mutat.* 37, 745–754. <https://doi.org/10.1002/humu.23013>.
 120. Han, B., Cao, Z., Tian, L., Zou, H., Yang, L., Zhu, W., and Liu, Y. (2016). Clinical presentation, gene analysis and outcomes in young patients with early-treated combined methylmalonic acidemia and homocystinemia (cblC type) in Shandong province, China. *Brain Dev.* 38, 491–497. <https://doi.org/10.1016/j.braindev.2015.10.016>.
 121. Keyfi, F., Abbaszadegan, M.R., Rolfs, A., Orolicki, S., Moghaddassian, M., and Varasteh, A. (2016). Identification of a novel deletion in the MMAA gene in two Iranian siblings with vitamin B12-responsive methylmalonic acidemia. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 21, 4. <https://doi.org/10.1186/s11658-016-0005-1>.
 122. Keyfi, F., Sankian, M., Moghaddassian, M., Rolfs, A., and Varasteh, A.R. (2016). Molecular, biochemical, and structural analysis of a novel mutation in patients with methylmalonyl-CoA mutase deficiency. *Gene* 576, 208–213. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.10.002>.
 123. Ku, C.A., Ng, J.K., Karr, D.J., Reznick, L., Harding, C.O., Weleber, R.G., and Pennesi, M.E. (2016). Spectrum of ocular manifestations in cobalamin C and cobalamin A types of methylmalonic acidemia. *Ophthalmic Genet.* 37, 404–414. <https://doi.org/10.3109/13816810.2015.1121500>.
 124. Peake, R.W.A. (2016). Increased C3 acylcarnitine concentration in a newborn. *Clin. Chem.* 62, 1410–1412. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2016.259705>.
 125. Pupavac, M., Watkins, D., Petrella, F., Fahiminiya, S., Janer, A., Cheung, W., Gingras, A.C., Pastinen, T., Muenzer, J., Majewski, J., et al. (2016). Inborn error of cobalamin metabolism associated with the intracellular accumulation of transcobalamin-bound cobalamin and mutations in ZNF143, which codes for a transcriptional activator. *Hum. Mutat.* 37, 976–982. <https://doi.org/10.1002/humu.23037>.
 126. Ruiz-Mercado, M., Vargas, M.T., de Soto, I.P., Pecellin, C.D., Sánchez, M.C., Delgado, M.A.B., Ruiz, R.B., Pérez-Simón, J.A., and Díaz-Aguado, A.H. (2016). Methionine synthase reductase deficiency (CblE): a report of two patients and a novel mutation. *Hematology* 21, 193–197. <https://doi.org/10.1179/1607845415y.0000000017>.
 127. Stojiljkovic, M., Klaassen, K., Djordjevic, M., Sarajlija, A., Brasil, S., Kerman, B., Grkovic, S., Kostic, J., Rodriguez-Pombo, P., Desviat, L.R., et al. (2016). Molecular and phenotypic characteristics of seven novel mutations causing branched-chain organic acidurias. *Clin. Genet.* 90, 252–257. <https://doi.org/10.1111/cge.12751>.
 128. Trefz, F.K., Scheible, D., Frauendienst-Egger, G., Huemer, M., Suomala, T., Fowler, B., Haas, D., and Baumgartner, M.R. (2016). Successful intravenous treatment of a patient with cobalamin C defect. *Mol. Genetic. Metab. Rep.* 6, 55–59. <https://doi.org/10.1016/j.ymgmr.2016.01.005>.
 129. Wong, D., Tortorelli, S., Bishop, L., Sellars, E.A., Schimmenti, L.A., Gallant, N., Prada, C.E., Hopkin, R.J., Leslie, N.D., Berry, S.A., et al. (2016). Outcomes of four patients with homocysteine remethylation disorders detected by newborn screening. *Genet. Med.* 18, 162–167. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.45>.
 130. Ardissino, G., Perrone, M., Tel, F., Testa, S., Morrone, A., Possenti, I., Tagliaferri, F., Dilena, R., and Menni, F. (2017). Late onset cobalamin disorder and hemolytic uremic syndrome: a rare cause of nephrotic syndrome. *Case Rep. Pediatr.* 2017, 2794060. <https://doi.org/10.1155/2017/2794060>.
 131. Bacci, G.M., Donati, M.A., Pasquini, E., Munier, F., Cavicchi, C., Morrone, A., Sodi, A., Murro, V., Garcia Segarra, N., Defilippi, C., et al. (2017). Optical coherence tomography morphology and evolution in cblC disease-related maculopathy in a case series of very young patients. *Acta Ophthalmol.* 95, e776–e782. <https://doi.org/10.1111/aos.13441>.
 132. Chen, M., Zhuang, J., Yang, J., Wang, D., and Yang, Q. (2017). Atypical hemolytic uremic syndrome induced by CblC subtype of methylmalonic acidemia: a case report and literature review. *Medicine* 96, e8284. <https://doi.org/10.1097/md.00000000000008284>.
 133. Devi, A.R.R., and Naushad, S.M. (2017). Targeted exome sequencing for the identification of complementation groups in methylmalonic aciduria: a south Indian experience. *Clin. Biochem.* 50, 68–72. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2016.08.016>.
 134. Han, L.S., Huang, Z., Han, F., Wang, Y., Gong, Z.W., and Gu, X.F. (2017). Eight novel MUT loss-of-function missense mutations in Chinese



- patients with isolated methylmalonic academia. *World J. Clin. Pediatr.* 13, 381–386. <https://doi.org/10.1007/s12519-016-0085-z>.
135. Komulainen-Ebrahim, J., Saastamoinen, E., Rahikkala, E., Helander, H., Hinttala, R., Risteli, L., Rantala, H., and Uusimaa, J. (2017). Intractable epilepsy due to MTR deficiency: importance of homocysteine analysis. *Neuropediatrics* 48, 467–472. <https://doi.org/10.1055/s-0037-1603976>.
136. Kumari, C., Kapoor, S., Varughese, B., Pollipali, S.K., and Ramji, S. (2017). Mutation analyses in selected exons of the MUT gene in Indian patients with methylmalonic academia. *Indian J. Clin. Biochem. : Indian J. Clin. Biochem.* 32, 266–274. <https://doi.org/10.1007/s12291-016-0600-y>.
137. Liu, J., Peng, Y., Zhou, N., Liu, X., Meng, Q., Xu, H., and Zhao, S. (2017). Combined methylmalonic acidemia and homocysteinemia presenting predominantly with late-onset diffuse lung disease: a case series of four patients. *Orphanet J. Rare Dis.* 12, 58. <https://doi.org/10.1186/s13023-017-0610-8>.
138. Maines, E., Morandi, G., Gugelmo, G., Ion-Popa, F., Camprostrini, N., Pasini, A., Vincenzi, M., Teofoli, F., Camilot, M., Bordugo, A., PAsini, A., and Bordugo, A. (2017). Vitamin B12 administration by subcutaneous catheter device in a cobalamin A (cblA) patient. *JIMD Rep.* 35, 29–31. https://doi.org/10.1007/8904_2016_20.
139. Nogueira, C., Marcao, A., Rocha, H., Sousa, C., Fonseca, H., Valongo, C., Vilarinho, L., and MArcao, A. (2017). Molecular picture of cobalamin C/D defects before and after newborn screening era. *J. Med. Screen* 24, 6–11. <https://doi.org/10.1177/0969141316641149>.
140. Potter, S.L., Venkatramani, R., Wenderfer, S., Graham, B.H., Vasudevan, S.A., Sher, A., Wu, H., Wheeler, D.A., Yang, Y., Eng, C.M., et al. (2017). Renal cell carcinoma harboring somatic TSC2 mutations in a child with methylmalonic acidemia. *Pediatr. Blood Cancer* 64, e26286. <https://doi.org/10.1002/psc.26286>.
141. Wu, L.Y., An, H., Liu, J., Li, J.Y., Han, Y., Zhou, A.H., Wang, F., and Jia, J.P. (2017). Manic-depressive psychosis as the initial symptom in adult siblings with late-onset combined methylmalonic aciduria and homocystinemia, cobalamin C type. *Chin. Med. J.* 130, 492–494. <https://doi.org/10.4103/0366-6999.199826>.
142. Yildirim, Z.K., Nexo, E., Rupar, T., and Büyükcavci, M. (2017). Seven patients with transcobalamin deficiency diagnosed between 2010 and 2014: a single-center experience. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 39, 38–41. <https://doi.org/10.1097/mp.0000000000000685>.
143. Barlas, U.K., Kihtr, H.S., Goknar, N., Ersoy, M., Akcay, N., and Sevketoğlu, E. (2018). Hemolytic uremic syndrome with dual caution in an infant: cobalamin C defect and complement dysregulation successfully treated with eculizumab. *Pediatr. Nephrol.* 33, 1093–1096. <https://doi.org/10.1007/s00467-018-3941-3>.
144. Critelli, K., McKiernan, P., Vockley, J., Mazariegos, G., Squires, R.H., Soltys, K., and Squires, J.E. (2018). Liver transplantation for propionic acidemia and methylmalonic acidemia: perioperative management and clinical outcomes. *Liver Transplant.* 24, 1260–1270. <https://doi.org/10.1002/lt.25304>.
145. De Simone, L., Capirchio, L., Roperto, R.M., Romagnani, P., Sacchini, M., Donati, M.A., and de Martino, M. (2018). Favorable course of previously undiagnosed Methylmalonic Aciduria with Homocystinuria (cblC type) presenting with pulmonary hypertension and aHUS in a young child: a case report. *Ital. J. Pediatr.* 44, 90. <https://doi.org/10.1186/s13052-018-0530-9>.
146. Gilson, R.C., Wallis, L., Yeh, J., and Gilson, R.T. (2018). Dementia, diarrhea, desquamating shellac-like dermatitis revealing late-onset cobalamin C deficiency. *JAAD case reports* 4, 91–94. <https://doi.org/10.1016/j.jacr.2017.09.016>.
147. Guéant, J.L., Chéry, C., Oussalah, A., Nadaf, J., Coelho, D., Josse, T., Flayac, J., Robert, A., Kosciński, I., Gastin, I., et al. (2018). APRDX1 mutant allele causes a MMACHC secondary epimutation in cblC patients. *Nat. Commun.* 9, 67. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02306-5>.
148. Imbard, A., Garcia Segarra, N., Tardieu, M., Broué, P., Bouchereau, J., Pichard, S., de Baulny, H.O., Slama, A., Mussini, C., Touati, G., et al. (2018). Long-term liver disease in methylmalonic and propionic acidemias. *Mol. Genet. Metabol.* 123, 433–440. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2018.01.009>.
149. Lemoine, M., François, A., Grangé, S., Sabant, M., Châtelet, V., Cassiman, D., Cornec-Le Gall, E., Ambrosetti, D., Deschênes, G., Benoist, J.F., and Guerrot, D. (2018). Cobalamin C deficiency induces a typical histopathological pattern of renal arteriolar and glomerular thrombotic microangiopathy. *Kidney Int. Rep.* 3, 1153–1162. <https://doi.org/10.1016/j.ekir.2018.05.015>.
150. Lin, Y., Lin, C., Lin, W., Zheng, Z., Han, M., and Fu, Q. (2018). Mild clinical features of isolated methylmalonic acidemia associated with a novel variant in the MMAA gene in two Chinese siblings. *BMC Med. Genet.* 19, 114. <https://doi.org/10.1186/s12881-018-0635-4>.
151. Martínez de Compañón, Z., Poblet-Puig, M., Vallès, G., Del Toro, M., Vialta, R., Moreno, A., and Balcells, J. (2018). Cobalamin disorder CblC presenting with hemolytic uremic syndrome and pulmonary hypertension. *Nefrologia* 38, 333–335. <https://doi.org/10.1016/j.nefro.2017.03.019>.
152. Myers, K.A., Dudley, R.W., and Srour, M. (2018). Hemiconvulsion-Hemiplegia-Epilepsy in a girl with cobalamin C deficiency. *Epileptic Disord.* 20, 545–550. <https://doi.org/10.1684/epd.2018.1017>.
153. Navarro, D., Azevedo, A., Sequeira, S., Ferreira, A.C., Carvalho, F., Fidalgo, T., Vilarinho, L., Santos, M.C., Calado, J., and Nolasco, F. (2018). Atypical adult-onset methylmalonic acidemia and homocystinuria presenting as hemolytic uremic syndrome. *CEN Case Rep.* 7, 73–76. <https://doi.org/10.1007/s13730-017-0298-6>.
154. Petropoulos, T.E., Ramirez, M.E., Granton, J., Licht, C., John, R., Moayed, Y., Morel, C.F., and McQuillan, R.F. (2018). Renal thrombotic microangiopathy and pulmonary arterial hypertension in a patient with late-onset cobalamin C deficiency. *Clin. Kid. J.* 11, 310–314. <https://doi.org/10.1093/ckj/sfx119>.
155. Prasun, P., Chapel-Crespo, C., Williamson, A., Chu, P., Oishi, K., and Diaz, G. (2018). Skin lesions in a patient with Cobalamin C disease in poor metabolic control. *J. Inherit. Metab. Dis.* 41, 279–280. <https://doi.org/10.1007/s10545-017-0102-y>.
156. Wang, C., Zhang, Y.Q., Zhang, S.H., Meng, Y.T., Lin, S.X., Cai, C.Q., and Shu, J.B. (2018). A novel two-nucleotide deletion of MMADHC gene causing cblD disease in a Chinese family. *Chin. Med. J.* 131, 2477–2479. <https://doi.org/10.4103/0366-6999.243561>.
157. Wang, S.J., Yan, C.Z., Liu, Y.M., and Zhao, Y.Y. (2018). Late-onset cobalamin C deficiency Chinese sibling patients with neuropsychiatric presentations. *Metab. Brain Dis.* 33, 829–835. <https://doi.org/10.1007/s11011-018-0189-3>.
158. Zhao, Z., Chu, C.C., Chang, M.Y., Chang, H.T., and Hsu, Y.L. (2018). Management of adult-onset methylmalonic acidemia with hypotonia and acute respiratory failure: a case report. *Medicine* 97, e11162. <https://doi.org/10.1097/md.00000000000011162>.
159. Zhou, W., Li, H., Wang, C., Wang, X., and Gu, M. (2018). Newborn screening for methylmalonic acidemia in a Chinese population: molecular genetic confirmation and genotype phenotype correlations. *Front. Genet.* 9, 726. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00726>.
160. Jamwal, M., Aggarwal, A., Sharma, P., Bansal, D., Trehan, A., Maitra, A., and Das, R. (2019). First report of homocystinuria-megaloblastic anaemia, cobalamin E complementation type, in an Indian child. *Pathology* 51, 95–98. <https://doi.org/10.1016/j.pathol.2018.07.008>.
161. Wang, S.J., Yan, C.Z., Wen, B., and Zhao, Y.Y. (2019). Clinical feature and outcome of late-onset cobalamin C disease patients with neuropsychiatric presentations: a Chinese case series. *Neuropsychiatric Dis. Treat.* 15, 549–555. <https://doi.org/10.2147/ndt.S196924>.
162. Wang, S.J., Zhao, Y.Y., and Yan, C.Z. (2019). Reversible encephalopathy caused by an inborn error of cobalamin metabolism. *Lancet* 393, e29. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(19\)30043-1](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(19)30043-1).

163. Wang, X., Yang, Y., Li, X., Li, C., and Wang, C. (2019). Distinct clinical, neuroimaging and genetic profiles of late-onset cobalamin C defects (cb1C): a report of 16 Chinese cases. *Orphanet J. Rare Dis.* 14, 109. <https://doi.org/10.1186/s13023-019-1058-9>.
164. Green, R., Allen, L.H., Bjørke-Monsen, A.L., Brito, A., Guéant, J.L., Miller, J.W., Molloy, A.M., Nexø, E., Stabler, S., Toh, B.H., et al. (2017). Vitamin B12 deficiency. *Nat. Rev. Dis. Prim.* 3, 17040. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.40>.
165. Rosenblatt, D.S., and Cooper, B.A. (1987). Inherited disorders of vitamin B12 metabolism. *Blood Rev.* 1, 177–182. [https://doi.org/10.1016/0268-960x\(87\)90033-6](https://doi.org/10.1016/0268-960x(87)90033-6).
166. Froese, D.S., and Gravel, R.A. (2010). Genetic disorders of vitamin B(1)2 metabolism: eight complementation groups—eight genes. *Expet Rev. Mol. Med.* 12, e37. <https://doi.org/10.1017/s1462399410001651>.
167. Oussalah, A., Levy, J., Berthezène, C., Alpers, D.H., and Guéant, J.L. (2020). Health outcomes associated with vegetarian diets: an umbrella review of systematic reviews and meta-analyses. *Clin. Nutr.* 39, 3263–3307. <https://doi.org/10.1016/j.clinu.2020.02.037>.
168. Guéant, J.L., Namour, F., Guéant-Rodríguez, R.M., and Daval, J.L. (2013). Folate and fetal programming: a play in epigenomics? *Trends Endocrinol. Metabol.* 24, 279–289. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2013.01.010>.
169. Guéant, J.L., Caillerez-Fofou, M., Battaglia-Hsu, S., Alberto, J.M., Freund, J.N., Dulluc, I., Adjalla, C., Maury, F., Merle, C., Nicolas, J.P., et al. (2013). Molecular and cellular effects of vitamin B12 in brain, myocardium and liver through its role as co-factor of methionine synthase. *Biochimie* 95, 1033–1040. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2013.01.020>.
170. Froese, D.S., Fowler, B., and Baumgartner, M.R. (2019). Vitamin B12, folate, and the methionine remethylation cycle—biochemistry, pathways, and regulation. *J. Inher. Metab. Dis.* 42, 673–685. <https://doi.org/10.1002/jimd.12009>.
171. Bundy, D.A.P., de Silva, N., Horton, S., Patton, G.C., Schultz, L., Jamison, D.T., Abubakara, A., Ahuja, A., Alderman, H., Allen, N., et al. (2018). Investment in child and adolescent health and development: key messages from Disease Control Priorities, 3rd Edition. *Lancet* 391, 687–699. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)32417-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)32417-0).
172. Mütze, U., Walter, M., Keller, M., Gramer, G., Garbade, S.F., Gleich, F., Haas, D., Posset, R., Grünert, S.C., Hennermann, J.B., et al. (2021). Health outcomes of infants with vitamin B12 deficiency identified by newborn screening and early treated. *J. Pediatr.* 235, 42–48. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2021.02.009>.
173. Patton, G.C., Sawyer, S.M., Santelli, J.S., Ross, D.A., Afifi, R., Allen, N.B., Arora, M., Azzopardi, P., Baldwin, W., Bonell, C., et al. (2016). Our future: a Lancet commission on adolescent health and wellbeing. *Lancet* 387, 2423–2478. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00579-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00579-1).
174. Huemer, M., and Baumgartner, M.R. (2019). The clinical presentation of cobalamin-related disorders: from acquired deficiencies to inborn errors of absorption and intracellular pathways. *J. Inher. Metab. Dis.* 42, 686–705. <https://doi.org/10.1002/jimd.12012>.
175. Huemer, M., Diodato, D., Martinelli, D., Olivieri, G., Blom, H., Gleich, F., Kölker, S., Kozich, V., Morris, A.A., Seifert, B., et al. (2019). Phenotype, treatment practice and outcome in the cobalamin-dependent remethylation disorders and MTHFR deficiency: data from the E-HOD registry. *J. Inher. Metab. Dis.* 42, 333–352. <https://doi.org/10.1002/jimd.12041>.
176. Fofou-Caillierez, M.B., Mrabet, N.T., Chéry, C., Dreumont, N., Flayac, J., Pupavac, M., Paoli, J., Alberto, J.M., Coelho, D., Camadro, J.M., et al. (2013). Interaction between methionine synthase isoforms and MMA5CHC: characterization in cblG-variant, cblG and cblC inherited causes of megaloblastic anaemia. *Hum. Mol. Genet.* 22, 4591–4601. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt308>.
177. Bassila, C., Ghemrawi, R., Flayac, J., Froese, D.S., Baumgartner, M.R., Guéant, J.L., and Coelho, D. (2017). Methionine synthase and methionine synthase reductase interact with MMA5CHC and with MMA5DHC. *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Basis Dis.* 1863, 103–112. <https://doi.org/10.1016/j.bbdis.2016.10.016>.
178. Selhub, J., Morris, M.S., and Jacques, P.F. (2007). In vitamin B12 deficiency, higher serum folate is associated with increased total homocysteine and methylmalonic acid concentrations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 19995–20000. <https://doi.org/10.1073/pnas.0709487104>.
179. Douaud, G., Refsum, H., de Jager, C.A., Jacoby, R., E Nichols, T., Smith, S.M., and Smith, A.D. (2013). Preventing Alzheimer's disease-related gray matter atrophy by B-vitamin treatment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110, 9523–9528. <https://doi.org/10.1073/pnas.1301816110>.
180. Smith, A.D., Smith, S.M., de Jager, C.A., Whitbread, P., Johnston, C., Agacinski, G., Oulhaj, A., Bradley, K.M., Jacoby, R., and Refsum, H. (2010). Homocysteine-lowering by B vitamins slows the rate of accelerated brain atrophy in mild cognitive impairment: a randomized controlled trial. *PLoS One* 5, e12244. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012244>.
181. Battaglia-Hsu, S.F., Ghemrawi, R., Coelho, D., Dreumont, N., Mosca, P., Hergalant, S., Gauchotte, G., Sequeira, J.M., Ndiongue, M., Houlgatte, R., et al. (2018). Inherited disorders of cobalamin metabolism disrupt nucleocytoplasmic transport of mRNA through impaired methylation/phosphorylation of ELAVL1/HuR. *Nucleic Acids Res.* 46, 7844–7857. <https://doi.org/10.1093/nar/gky634>.
182. Ghemrawi, R., Arnold, C., Battaglia-Hsu, S.F., Pourié, G., Trinh, I., Bassila, C., Rashka, C., Wiedemann, A., Flayac, J., Robert, A., et al. (2019). SIRT1 activation rescues the mislocalization of RNA-binding proteins and cognitive defects induced by inherited cobalamin disorders. *Metab. Clin. Exp.* 101, 153992. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2019.153992>.
183. Rashka, C., Hergalant, S., Dreumont, N., Oussalah, A., Camadro, J.M., Marchand, V., Hassan, Z., Baumgartner, M.R., Rosenblatt, D.S., Feillet, F., et al. (2020). Analysis of fibroblasts from patients with cblC and cblG genetic defects of cobalamin metabolism reveals global dysregulation of alternative splicing. *Hum. Mol. Genet.* 29, 1969–1985. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddaa027>.
184. Kosgei, V.J., Coelho, D., Gueant-Rodríguez, R.M., and Gueant, J.L. (2020). Sirt1-PPARS cross-talk in complex metabolic diseases and inherited disorders of the one carbon metabolism. *Cells* 9. <https://doi.org/10.3390/cells9081882>.
185. Dreumont, N., Mimoun, K., Pourié, C., Quadros, E.V., Alberto, J.M., Umoret, R., Helle, D., Robert, A., Daval, J.L., Guéant, J.L., and Pourié, G. (2021). Glucocorticoid receptor activation restores learning memory by modulating hippocampal plasticity in a mouse model of brain vitamin B12 deficiency. *Mol. Neurobiol.* 58, 1024–1035. <https://doi.org/10.1007/s12035-020-02163-2>.
186. Pourié, G., Martin, N., Daval, J.L., Alberto, J.M., Umoret, R., Guéant, J.L., and Bossenmeyer-Pourié, C. (2020). The stimulation of neurogenesis improves the cognitive status of aging rats subjected to gestational and perinatal deficiency of B9-12 vitamins. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 8008. <https://doi.org/10.3390/ijms21218008>.
187. Bossenmeyer-Pourié, C., Smith, A.D., Lehmann, S., Deramecourt, V., Sablonnière, B., Camadro, J.M., Pourié, G., Pourié, G., Kerek, R., Helle, D., et al. (2019). N-homocysteinylation of tau and MAP1 is increased in autopsy specimens of Alzheimer's disease and vascular dementia. *J. Pathol.* 248, 291–303. <https://doi.org/10.1002/path.5254>.
188. Weisfeld-Adams, J.D., McCourt, E.A., Diaz, G.A., and Oliver, S.C. (2015). Ocular disease in the cobalamin C defect: a review of the literature and a suggested framework for clinical surveillance. *Mol. Genet. Metabol.* 114, 537–546. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2015.01.012>.
189. Matmat, K., Guéant-Rodríguez, R.M., Oussalah, A., Wiedemann-Fode, A., Dionisi-Vici, C., Coelho, D., Guéant, J.L., Guéant, J.L., Gueant, J.L., and Conart, J.B. (2021). Ocular manifestations in patients with inborn errors of intracellular cobalamin metabolism: a systematic review. *Hum. Genet.*, 1–13. <https://doi.org/10.1007/s00439-021-02350-8>.
190. Eikelboom, J.W., Lonn, E., Genest, J., Jr., Hankey, G., and Yusuf, S. (1999). Homocyst(e)line and cardiovascular disease: a critical review of



218. Kopanos, C., Tsiolkas, V., Kouris, A., Chapple, C.E., Albarca Aguilera, M., Meyer, R., and Massouras, A. (2019). VarSome: the human genomic variant search engine. *Bioinformatics* 35, 1978–1980. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty897>.
219. Landrum, M.J., Lee, J.M., Benson, M., Brown, G.R., Chao, C., Chitipiralla, S., Gu, B., Hart, J., Hoffman, D., Jang, W., et al. (2018). ClinVar: improving access to variant interpretations and supporting evidence. *Nucleic Acids Res.* 46, D1062–D1067. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1153>.
220. Lek, M., Karczewski, K.J., Minikel, E.V., Samocha, K.E., Banks, E., Fennell, T., O'Donnell-Luria, A.H., Ware, J.S., Hill, A.J., Cummings, B.B., et al. (2016). Analysis of protein-coding genetic variation in 60, 706 humans. *Nature* 536, 285–291. <https://doi.org/10.1038/nature19057>.
221. Jusufi, J., Suormala, T., Burda, P., Fowler, B., Froese, D.S., and Baumgartner, M.R. (2014). Characterization of functional domains of the cbID (MMADHC) gene product. *J. Inher. Metab. Dis.* 37, 841–849. <https://doi.org/10.1007/s10545-014-9709-4>.
222. Mah, W., Deme, J.C., Watkins, D., Fung, S., Janer, A., Shoubridge, E.A., Rosenblatt, D.S., and Coulton, J.W. (2013). Subcellular location of MMACHC and MMADHC, two human proteins central to intracellular vitamin B(12) metabolism. *Mol. Genet. Metabol.* 108, 112–118. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2012.11.284>.
223. Froese, D.S., Kopec, J., Fitzpatrick, F., Schuller, M., McCorvie, T.J., Chalk, R., Plessl, T., Fettelschoss, V., Fowler, B., Baumgartner, M.R., and Yue, W.W. (2015). Structural insights into the MMACHC-MMADHC protein complex involved in vitamin B12 trafficking. *J. Biol. Chem.* 290, 29167–29177. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.683268>.

6.2 Etude n2 – NGS – Human Genetics (IF 6.099)

Human Genetics
https://doi.org/10.1007/s00439-021-02358-0

ORIGINAL INVESTIGATION



Diagnostic yield of clinical exome sequencing as a first-tier genetic test for the diagnosis of genetic disorders in pediatric patients: results from a referral center study

Jean-Philippe Mergnac^{1,2} · Arnaud Wiedemann^{1,3,4} · Céline Chery^{1,4,5} · Jean-Marie Ravel¹ · Farès Namour^{1,4,5} · Jean-Louis Guéant^{1,4,5} · François Feillet^{1,2,4} · Abderrahim Oussalah^{1,4,5}

Received: 8 May 2021 / Accepted: 28 August 2021

© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2021

Abstract

The emergence of next-generation sequencing enabled a cost-effective and straightforward diagnostic approach to genetic disorders using clinical exome sequencing (CES) panels. We performed a retrospective observational study to assess the diagnostic yield of CES as a first-tier genetic test in 128 consecutive pediatric patients addressed to a referral center in the North-East of France for a suspected genetic disorder, mainly an inborn error of metabolism between January 2016 and August 2020. CES was performed using the TruSight One (4811 genes) or the TruSight One expanded (6699 genes) panel on an Illumina sequencing platform. The median age was 6.5 years (IQR 2.0–12.0) with 43% of males (55/128), and the median disease duration was 7 months (IQR 1–47). In the whole analysis, the CES diagnostic yield was 55% (70/128). The median test-to-report time was 5 months (IQR 4–7). According to CES indications, the CES diagnostic yields were 81% (21/26) for hyperlipidemia, 75% (6/8) for osteogenesis imperfecta, 64% (25/39) for metabolic disorders, 39% (10/26) for neurological disorders, and 28% (8/29) for the subgroup of patients with miscellaneous conditions. Our results demonstrate the usefulness of a CES-based diagnosis as a first-tier genetic test to establish a molecular diagnosis in pediatric patients with a suspected genetic disorder with a median test-to-report time of 5 months. It highlights the importance of a close interaction between the pediatrician with expertise in genetic disorders and the molecular medicine physician to optimize both CES indication and interpretation.

Graphic abstract

Diagnostic yield of clinical exome sequencing (CES) as a first-tier genetic test for diagnosing genetic disorders in 128 consecutive pediatric patients referred to a reference center in the North-East of France for a suspected genetic disorder, mainly an inborn error of metabolism between January 2016 and August 2020. The CES diagnostic yields are reported in the whole population and patients' subgroups (hyperlipidemia, osteogenesis imperfecta, metabolic diseases, neurological disorders, miscellaneous conditions) (Icons made by Flaticon, flaticon.com; CC-BY-3.0).

✉ Abderrahim Oussalah
abderrahim.oussalah@univ-lorraine.fr
Arnaud Wiedemann
arnaud.wiedemann@univ-lorraine.fr

¹ Reference Center for Inborn Errors of Metabolism (ORPHA67872), University Hospital of Nancy, 54000 Nancy, France

² Department of Pediatrics, University Hospital of Nancy, 54000 Nancy, France

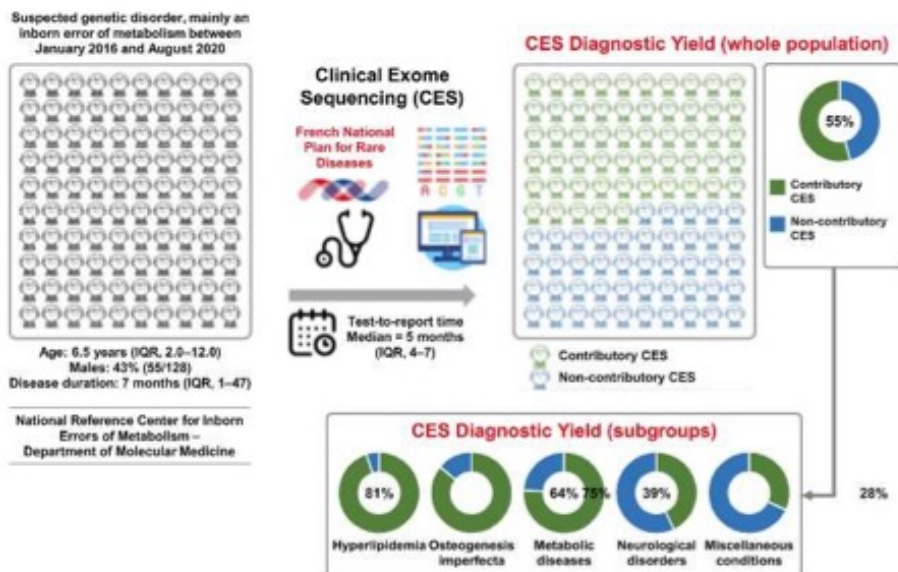
³ Pediatric Intensive Care Unit, University Hospital of Nancy, 54000 Nancy, France

⁴ Nutrition, Genetics, and Environmental Risk Exposure (NGERE), Faculty of Medicine of Nancy, University of Lorraine, INSERM UMR_S 1256, 54000 Nancy, France

⁵ Department of Molecular Medicine, Division of Biochemistry, Molecular Biology, and Nutrition, University Hospital of Nancy, 54000 Nancy, France

Published online: 08 September 2021

Springer



Introduction

Genetic disorders correspond to a heterogeneous group of diseases caused by a change in an individual's DNA sequence. Genetic disorders are numerous and geographically disparate, with an estimated 263–446 million people affected worldwide, corresponding to a global population prevalence of 3.5–5.9% (Nguengang Wakap et al. 2020). The emergence of next-generation sequencing (NGS) has enabled a simple and cost-effective diagnostic approach to genetic disorders through full-exome sequencing (Adams and Eng 2018) or clinical exome sequencing (CES) panels, also called 'Medical exome sequencing' or 'Large panel sequencing' (Chérot et al. 2018; Kirk et al. 2019; Lee et al. 2014; Vega et al. 2016). Exome sequencing broadened genetic knowledge for several inherited disorders such as metabolic (Anikster et al. 2017), mitochondrial (Haack et al. 2010; Taylor et al. 2014), neurodevelopmental (Harripaul et al. 2018; Vissers et al. 2010), or neuromuscular (Chardon et al. 2015; Cossins et al. 2013) diseases.

Metabolic disorders are conditions that disrupt the normal metabolism of human cells. Thousands of enzymes involved in many interrelated metabolic pathways are required for these processes. The degradation of the normal function of these enzymes induces varying degrees of alterations in the metabolic homeostasis, which can lead to an innate error of the metabolism. Classically, inborn errors of metabolism are

severe in their presentation, and the precise identification of their molecular basis is essential for an appropriate therapeutic approach and genetic counseling (Fukao and Nakamura 2019; Saudubray and Garcia-Cazorla 2018; Vernon 2015).

In the present work, we assessed the diagnostic yield of CES as a first-tier genetic test in 128 consecutive pediatric patients addressed to a referral center in the North-East of France for a suspected genetic disorder, mainly an inborn error of metabolism.

Materials and methods

French framework for the diagnosis and management of genetic disorders

The management of genetic disorders in France is organized around specialized reference centers within the framework of the "French National Plan for Rare Diseases". Eight reference centers are devoted to the diagnosis and management of inborn errors of metabolism. One of these centers is located at the University Hospital of Nancy (ORPHA67872) and receives patients referred by their treating physician when a genetic disease, particularly of metabolic origin, is suspected. Consultations are conducted by a senior pediatrician with expertise in genetic disorders and inborn errors of metabolism. Additional investigations

are performed at the discretion of the senior pediatrician and may include CES. Genetic testing is performed after the formal written consent from the proband's parents. In France, in the setting of the diagnosis of genetic disorders and inborn errors of metabolism, the CES is 100% covered by the French health care system. In France, six diseases are subject to newborn screening through dried blood spot assays and include phenylketonuria, medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) deficiency, congenital adrenal hyperplasia, congenital hypothyroidism, sickle cell disease, and cystic fibrosis. Newborns with positive screening results benefit from a targeted genetic test and are not assessed using CES.

Study design, setting, and patients' selection criteria

We carried out a retrospective observational study on consecutive patients followed at the Reference Center for Inborn Errors of Metabolism of the University Hospital of Nancy (France). The inclusion criteria were: (i) pediatric patient; (ii) suspected genetic disorder; (iii) admission to hospital or consultation at the Reference Center for Inborn Errors of Metabolism between January 2016 and August 2020. The exclusion criteria were as follows: (i) patients with a previously confirmed diagnosis of genetic disorder on the date of the first consultation; (ii) patients awaiting an in-depth initial clinical metabolic assessment; (iii) no genetic testing required for diagnostic workup; (iv) CES in progress without a final clinical report; and (v) patients with suspected phenylketonuria or hyperphenylalaninemia for whom a dedicated molecular diagnostic approach is available via Sanger and/or targeted panel sequencing. The study was observational, meaning that all clinical evaluations, biochemical investigations, imaging examinations, and clinical diagnoses were performed at the discretion of the treating physicians. The institutional review board of the University Hospital of Nancy approved the study.

Data collected for the study

Clinical data were retrieved through electronic chart review using DxCare® software (Dedalus France, Le Plessis Robinson, France). For each patient, the following data were collected: (i) demographic data: age at first medical consultation, sex; (ii) patient' medical history: date of onset of symptoms, date of the first consultation at the referral center; (iii) data related to the CES: date of prescription of the CES, date of the molecular diagnosis report established by the molecular medicine physician, number of genetic variants retained in the molecular diagnosis, variant classification according to the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) criteria (Richards et al. 2015), and the

patients' genotype status for the genetic variants retained in the molecular diagnosis report.

Next-generation sequencing

We performed CES using the TruSight One panel on an Illumina MiSeq platform (Illumina, Evry, France) or TruSight One expanded panel on an Illumina NextSeq 550 platform at the University Hospital of Nancy and the Functional Genomics Facility of the INSERM unit UMR_S 1256 (NGERE), as previously described (Oussalah et al. 2020; Wiedemann et al. 2020). At the Department of Molecular Medicine at the University Hospital of Nancy and the National Reference Center for Inborn Errors of Metabolism, we opted for a strategy based on Illumina TruSight captures that cover a large number of disease-associated genes instead of choosing a full-exome-based approach. The TruSight One Sequencing Panel provides comprehensive coverage of > 4800 disease-associated genes, while the TruSight One Expanded Sequencing Panel targets ~ 1900 additional genes with recent disease associations in the scientific literature (Supplemental Table 1). We used Nextera and Nextera Flex enrichment solutions with the TruSight One and TruSight One Expanded captures, respectively. The TruSight One Expanded and TruSight One panels cover 100% and 82% (145/176) of the 176 mitochondrial nuclear genes reported in Supplemental Table 1. Bioinformatics analysis was performed as previously described (Gueant et al. 2018; Renard et al. 2019; Wiedemann et al. 2020). The Burrows–Wheeler Aligner (BWA) software package was used to map all reads to GRCh37/hg19 annotation using the BWA-MEM algorithm. PCR duplicates were removed from alignments using the Picard (MarkDuplicates) tool (<http://broadinstitute.github.io/picard>). Indels were realigned using the Genome Analysis Toolkit (GATK) (Van der Auwera et al. 2013). SNVs and short indels were called using the GATK HaplotypeCaller software (Van der Auwera et al. 2013). We used the following strategy for filtering and prioritizing the genetic variants: Step #1: Import all retrieved genetic variants; Step #2: Retain only low frequency and rare variants by excluding variants with a reported alternative allele frequency (AAF) > 5% in the following databases: The Exome Aggregation Consortium (ExAC) and the Genome Aggregation Database (gnomAD Exomes). The aim of step #2 is to retain rare (AAF < 1%) and low-frequency (AAF < 5%) variants that exhibit relatively large effects on disease risk, such as those involved in severe monogenic diseases (Singleton et al. 2014); Step #3: Exclude intronic variants other than splice donor, splice acceptor or splice region variants or synonymous variants; Step #4: Prioritization of genetic variants for their association with the studied phenotype using the SVS-PhoRank gene ranking algorithm based on the Phevor algorithm (Singleton et al. 2014). The Phevor algorithm

scores ontology terms based on their proximity to patient's phenotypes. The SVS-PhoRank score was calculated according to the RefSeq Genes 105v2, NCBI gene source, using the following ontologies: Human Phenotype Ontology, Gene Ontology, and OMIM Phenotype Ontology. Functional variant annotation was performed using the following tools: MutationTaster (Schwarz et al. 2014), Functional Analysis through Hidden Markov Models (FATHMM) (Shihab et al. 2013), MetaSVM/Metal.R scores (Dong et al. 2015), Sorting Tolerant From Intolerant (SIFT) (Kumar et al. 2009), Protein Variation Effect Analyzer (Provean) (Choi and Chan 2015), and deleterious annotation of genetic variants using neural networks (DANN) (Quang et al. 2015). Variant pathogenicity was reported according to the ACMG criteria (Richards et al. 2015). All retained and top-prioritized variants were systematically assessed for their ClinVar annotation (Landrum et al. 2018). All the genetic variants retained in the molecular diagnosis report had to meet high-quality metric criteria [read depth (RD) > 20, alt-read ratio (ARR) > 0.2, genotype quality score (GQ) of 99]. All the genetic variants retained in the bioinformatics analysis were confirmed by visual inspection of the read-level data of BAM files. Sanger confirmatory sequencing has been performed in rare cases of variants with suboptimal quality metrics indicators (e.g., splice donor or acceptor variants, homozygous variants). Large structural variations were not assessed. All bioinformatics analyses, including the SVS-PhoRank gene ranking algorithm, were performed using the SNP & Variation Suite (v8.9.0; Golden Helix, Inc., Bozeman, MT, USA).

Classification of CES results

We considered a CES as contributory if it allowed retaining in the CES report at least one genetic variant consistent with the patient's clinical phenotype in case of a dominant disorder or at least two genetic variants consistent with the patient's clinical phenotype in case of a recessive disorder according to the OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man®) database (Amberger et al. 2019). We considered a CES as non-contributory if no genetic variant was found compatible with the patient's clinical phenotype or if only one putative genetic variant was reported in the setting of a recessive disorder.

Study aims

The main objective of the study was to assess the diagnostic yield of the CES, defined as the proportion of patients with a contributory CES in the whole population. The secondary objective of the study was to assess the diagnostic yield of the CES according to five patients' subgroups: group #1: osteogenesis imperfecta; group #2: an inborn error of metabolism with evocative biological findings; group #3:

dyslipidemia; group #4: neurological disorders including mental and psychomotor retardation, dystonia, and epileptic syndromes; and group #5: miscellaneous conditions, defined as suspected genetic disorders that have not been classified into one of four categories above. This classification in five subgroups was based on the recruitment of the reference center.

Statistical analysis

All quantitative variables are shown as the median and interquartile range (IQR, 25th–75th percentile). Categorical variables are expressed as proportions. We estimated the diagnostic yield of CES using an intention-to-diagnose analysis, considering all the patients who underwent CES. We carried out Venn diagram analyses using the Venn diagram tool (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/>).

Results

Study population

Between January 2016 and August 2020, 338 patients were referred to the Reference Center for Inborn Errors of Metabolism of the University Hospital of Nancy. Two hundred and ten patients were excluded from the current study for the following reasons: no genetic test necessary for the diagnostic workup ($n = 127$); genetic testing previously carried out ($n = 48$); and patients with hyperphenylalaninemia, which is not diagnosed through a CES strategy at the referral center (diagnosis made by a targeted NGS panel of eight genes or Sanger sequencing) ($n = 35$). A total of 128 patients were included in the study. The median age was 6.5 years (IQR 2.0–12.0) with 43% of males (55/128), and the median disease duration was 7 months (IQR 1–47).

Description and diagnostic yield of the clinical exome sequencing in the whole population

On the 128 patients analyzed, 70 had a contributory CES, which corresponds to an intention-to-diagnose diagnostic yield of 55% (70/128) with a median test-to-report time of 5 months (IQR 4–7) (Table 1). A total of 99 genetic variants were retained in the CES report in 82 patients (Supplemental Table 2). Among these patients, 66 exhibited at least one genetic variant classified as pathogenic or likely pathogenic, corresponding to a CES efficiency of 52% (Supplemental Tables S3 and S4, and Supplemental Fig. S1). When variants of uncertain significance were considered, the CES efficiency was 63% (80/128). Considering the ACMG classification of the 99 variants, we investigated the distribution of genetic variants among the 82 patients using Venn diagram

Table 1 Results of clinical exome sequencing as a first-tier genetic test in the 128 consecutive pediatric patients included in the study

	Osteogenesis imperfecta (n = 8)	Metabolic disorders (n = 39)	Hyperlipidemia (n = 26)	Neurological disorders (n = 26)	Miscellaneous conditions (n = 29)	Total (n = 128)
Demographics						
Age (years)—median (IQR, 25th–75th)	3.0 (0.5–12.0)	5.0 (1.3–12.0)	9.5 (5.0–11.0)	5.5 (3.0–11.0)	3.0 (0.8–12.0)	6.5 (2.0–12.0)
Male sex—n/N (%)	2/8 (25%)	19/39 (49%)	13/26 (50%)	9/26 (35%)	12/29 (41%)	55/128 (43%)
Disease duration (months), median (IQR, 25th–75th)	3.0 (1.5–50.5)	7.0 (0.0–55.8)	3.0 (0.0–65.0)	25.0 (9.0–48.0)	4.0 (1.0–21.8)	7 (1.0–47.0)
Clinical exome sequencing results						
Diagnostic yield—n/N (%)	6/8 (75%)	25/39 (64%)	21/26 (81%)	10/26 (39%)	8/29 (28%)	70/128 (55%)
Number of genetic variants retained in the molecular diagnosis	8	40	25	10	16	99
ACMG classification—n (%)						
Benign	0 (0%)	4 (10%)	1 (4%)	0 (0%)	1 (6%)	6 (6%)
Likely benign	0 (0%)	0 (0%)	1 (4%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (1%)
Uncertain significance	3 (38%)	5 (13%)	3 (12%)	1 (10%)	7 (44%)	19 (19%)
Likely pathogenic	1 (12%)	17 (43%)	12 (48%)	8 (80%)	8 (50%)	46 (46%)
Pathogenic	4 (50%)	14 (35%)	8 (32%)	1 (10%)	0 (0%)	27 (27%)
Genotype status—n (%)						
Heterozygous	7 (88%)	15 (45%)	25 (100%)	8 (80%)	8 (62%)	63 (71%)
Homozygous	1 (12%)	11 (34%)	0 (0%)	2 (20%)	2 (15%)	16 (18%)
Compound Heterozygous	0 (0%)	7 (21%)	0 (0%)	0 (0%)	3 (23%)	10 (11%)
Test-to-report time (months)*—median (IQR, 25th–75th)	5 (4–7)	5 (4–11)	4 (3–6)	5 (3–6)	6 (4–7)	5 (4–7)

IQR interquartile range, n number of observations, N total number of patients; % percentage, ACMG American College of Medical Genetics and Genomics

*Test-to-report time: time delay between the prescription of the clinical exome sequencing by the pediatrician and the finalization of the clinical report by the molecular medicine physician

analysis (Supplemental Table S4 and Supplemental Fig. S1). The proportion of patients exhibiting only pathogenic, likely pathogenic, or uncertain significance variants, were 28% (23/82), 46% (38/82), and 16% (13/82), respectively. Ten percent (8/82) of patients had a combination of genetic variants with varying pathogenicity according to ACMG criteria (Supplemental Table S4 and Supplemental Fig. S1).

Diagnostic yield of the clinical exome sequencing according to disease subgroups

Group #1: Osteogenesis imperfecta

Eight patients had CES for a suspected diagnosis of osteogenesis imperfecta. Among them, six had contributory CES (three patients were diagnosed with type II osteogenesis imperfecta [COL1A1], one with type I osteogenesis imperfecta [COL1A1], one with Bruck Syndrome [PLOD2], and one with primary juvenile osteoporosis [LRP5]). One patient with true bone fragility had non-contributory CES. One patient had an unnecessary CES (child shaken by his parents

after further investigations). In this subgroup, the CES yield was 75% (6/8) (Table 1).

Group #2: Metabolic disease with evocative biological findings

Thirty-nine patients had a CES for a suspected metabolic disease with an evocative phenotype. Among them, 25 had contributory CES (two patients were diagnosed with a peroxisome biogenesis disorder type 1A [PEX1], two with alkaptonuria [HGD], one with mucopolysaccharidosis type IV A [GALNS], one with hypophosphatemic rickets [PHEX], one with congenital disorder of glycosylation type 1c [MAGT1], one with galactosemia type I [GALT], three with Fabry disease [GLA], two with Leigh syndrome, one with mitochondrial complex IV deficiency [SURF1], one with propionic acidemia [PCCA], one with methylmalonic aciduria and homocystinuria *cbII* type [ABCD4], one with congenital sucrase-isomaltase deficiency [SI], two with methylmalonic aciduria due to methylmalonyl-CoA mutase deficiency [MMUT], one with glycine encephalopathy

[*GLDC*], one with succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency [*ALDH5A1*], one with combined malonic and methylmalonic aciduria [*ACSF3*], one with infantile liver failure syndrome [*NBAS*], one with MELAS Syndrome [*MTTL1*], and one with aspartylglucosaminuria [*AGA*]). CES was non-contributory in 14 patients, including six patients with an unnecessary CES (1 suspected diagnostic of multiple acyl-CoA dehydrogenation deficiency on acylcarnitine profile in whom the diagnosis or avoidant/restrictive food intake disorder was made later; 1 Fabry disease screening in a patient without any symptoms; three patients with biological assessment and symptoms normalized spontaneously; one patient alleging false symptoms). In the subgroup of patients with metabolic disease and evocative biological findings, the CES yield was 64% (25/39) (Table 1).

Group #3: Hyperlipidemia

Twenty-six patients underwent CES for hyperlipidemia. Among them, 21 had contributory CES (17 patients were diagnosed with familial hypercholesterolemia type I [*LDLR*], two with familial hypercholesterolemia type II [*APOB*], and two with deficiencies in lipoprotein lipase [*LPL*]). CES was non-contributory in five patients, including four patients with an unnecessary CES (two patients normalized their lipid profile after a lowering lipid diet without associated pharmacological treatment, and two had hyperlipidemia in association with obesity). In the subgroup of patients with hyperlipidemia, the CES yield was 81% (21/26) (Table 1).

Group #4: Neurological disorders

Twenty-six patients underwent CES for suspected neurological disorders. Among them, 10 had contributory CES (one patient was diagnosed with early infantile epileptic encephalopathy [*CDKL5*], one with Hutchinson–Gilford progeria syndrome [*LMNA*], 1 with Emery–Dreifuss muscular dystrophy [*SYNE1*], one with episodic ataxia type I [*KCNA1*], one with Johanson–Blizzard syndrome (*UBR1*), one with spastic paraplegia [*KIF1A*], one with hereditary sensory neuropathy type ID [*ATL1*], one with Vulto–Van Silfhout–De Vries Syndrome [*DEAF1*], one with mental retardation autosomal recessive 46 [*NDST1*], and one with Charcot Marie Tooth type 2A1 [*KIF1B*]). CES was non-contributory in sixteen patients, including three with unnecessary CES (one patient with epileptic seizures with hypoglycemia in a context of functional hyperinsulinism in adolescence with total and spontaneous resolution; one patient with a Munchausen syndrome by proxy; and one patient with a psychomotor delay that recovered spontaneously). In the subgroup of patients with neurological disorders, the CES yield was 39% (10/26) (Table 1).

Group #5: Miscellaneous conditions

Twenty-nine patients underwent CES for a suspected genetic disorder not classified in the four subgroups mentioned above. Among them, eight had contributory CES (two were diagnosed with susceptibility to insulin resistance [*PPP1R3A*; *HNFI1A*], one patient with Cockayne syndrome A [*ERCC8*], one with arrhythmogenic right ventricular dysplasia [*RYR2*], one with familial cold inflammatory syndrome-1 [*NLRP3*], one with inflammatory bowel disease [Crohn disease] [*NOD2*], one auto-immune polyendocrine syndrome type I [*AIRE*], one patient with a diagnosis of immune-deficiency). CES was non-contributory in 21 patients, including four with unnecessary CES (one family screening in a healthy child; three patients with laboratory assessment and clinical conditions that spontaneously normalized). In the subgroup of patients with miscellaneous conditions, the CES yield was 28% (8/29) (Table 1).

Discussion

Using a referral center cohort of 128 consecutive pediatric patients who underwent CES as a first-tier genetic test for a suspected genetic disorder, including inborn errors of metabolism, we report a CES diagnostic yield of 55%. According to the five subgroups identified, the diagnostic yield of CES was 28% when miscellaneous conditions were considered and reached 81% among children with dyslipidemia. Our results demonstrate the usefulness of CES as a straightforward tool to establish a molecular diagnosis in pediatric patients with a suspected genetic disorder with a median test-to-report time of 5 months.

In the bioinformatics analysis of the CES, we report a combined approach based on several strategies, particularly the classical method of variant filtration and annotation and the systematic use of a phenotype-driven algorithm for variant prioritization that allowed comprehensive genome analysis. In our phenotype-driven strategy, we used the SVS-PhoRank gene ranking tool based on the Phevor algorithm (Singleton et al. 2014), which has been shown to improve the diagnostic accuracy for patients with a typical disease phenotype and those with atypical disease presentations (Singleton et al. 2014).

Exome and whole-genome sequencing has been evaluated in the diagnosis of genetic diseases with more available evidence for exome sequencing, which showed molecular diagnostic efficiency ranging from 10 to 51%, depending on the disease background (Australian Genomics Health Alliance Acute Care et al. 2020; de Ligt et al. 2012; Deciphering Developmental Disorders 2015; Dewey et al. 2014; Groopman et al. 2019; Lee et al. 2014; Lord et al. 2019; Lupski et al. 2010; Meng et al. 2017; Petrovski et al. 2019; Rauch

et al. 2012; Sparks et al. 2020; Tarailo-Graovac et al. 2016; Taylor et al. 2014; Yang et al. 2013). In a cohort of over 3000 patients with chronic kidney diseases, exome sequencing allowed a genetic diagnosis in 10% of cases (Groopman et al. 2019). In 814 patients with a suspected genetic disorder, the CES diagnostic rate was 26% (Lee et al. 2014). In a series of 127 fetuses with unexplained nonimmune hydrops fetalis, exome sequencing identified a diagnostic genetic variant in 29% of cases (Sparks et al. 2020). In 108 critically ill pediatric patients with suspected monogenic conditions in Australia, exome sequencing had a diagnostic yield of 51% (Australian Genomics Health Alliance Acute Care et al. 2020). These data demonstrate a better diagnostic yield of CES in pediatric populations when compared to adult populations.

Our results are in line with the literature data and confirm the better performance of CES in children with a clinical picture that suggests a specific diagnosis (e.g., hyperlipemia, osteogenesis imperfecta, metabolic disease) compared to those with clinical features that are not suggestive of a specific syndrome or disorder. Indeed, the diagnostic yield in pediatric neurological disorders for CES has been reported between 30 and 40% (Ganapathy et al. 2019; Marques Matos et al. 2019; Wu et al. 2018), while it was higher in patients with osteogenesis imperfecta (~96%) (Madhuri et al. 2021) or those with suspected metabolic disorders or monogenic conditions with an acute presentation in infancy (~50 to 80%) (Australian Genomics Health Alliance Acute Care et al. 2020; Yubero et al. 2016). It should be noted that in the study by Yubero et al., the diagnostic yield was higher in patients with specific clinical and laboratory findings compared to those without specific presentation (78% vs. 16%, respectively) (Yubero et al. 2016).

Children with rare diseases often exhibit diagnostic wandering for several years before a genetic test is indicated. CES allows an efficient and rapid diagnosis in these children, provided that the patient's phenotype is carefully analyzed. In this perspective, a close interaction between the pediatricians and the molecular medicine physicians is crucial to optimize CES indications and discuss the relevance of the variants highlighted, particularly those of uncertain significance.

We acknowledge several potential limitations of the study that should be taken into account in interpreting our results. First, we report results from a single-center study that need to be confirmed in independent cohorts. Second, the CES diagnostic yields that we report in our study may be subject to bias toward increased diagnostic yield because the selection of patients for CES testing was made by pediatricians who have expertise in the field of inherited metabolic diseases. Third, given the constantly evolving knowledge of gene and variant annotations, non-contributory CES may in the future reveal

variants upgraded for their pathogenicity or genes not yet annotated with respect to the patients' phenotype. Fourth, the efficiency of CES is suboptimal in detecting deep intronic or regulatory mutations and copy number variants (CNV). In this setting, whole-genome sequencing exhibited an improved diagnostic yield compared with targeted gene sequencing panels, in particular by highlighting structural and non-exonic sequence variants not detectable with whole-exome sequencing (Lionel et al. 2018). Our study has several strengths. First, we report one of the most extensive pediatric series of consecutive patients that evaluated the diagnostic yield of a large CES panel. Second, we report results on CES use in the real-life setting with a median test-to-report time of 5 months that was compatible with effective patient care in close collaboration between the pediatricians and molecular medicine physicians. Third, in our bioinformatics analysis pipeline, we systematically combined classical methods of variant filtration and annotation with the SVS-PhoRank phenotype-driven computational algorithm, in line with our molecular diagnostic strategy based on gene captures that covered a large number of disease-associated genes.

In conclusion, in this consecutive series of 128 pediatric patients with suspected genetic disorders, our study demonstrates the usefulness of a CES-based diagnosis as a first-tier genetic test with a median test-to-report time of 5 months. Our study highlights the importance of a close interaction between the pediatrician with expertise in genetic disorders and the molecular medicine physician to optimize both the indication and the interpretation of CES. Furthermore, we have shown that extensive phenotyping of patients improves the diagnostic performance of CES.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s00439-021-02358-0>.

Author contributions J-PM: conceptualization, validation, formal analysis, investigation, writing—original draft, writing—review and editing; AW: conceptualization; validation; formal analysis; investigation; writing—original draft; writing—review and editing; supervision; CC: software, resources, writing—review and editing; J-MR: investigation; writing—review and editing; FN: software, resources, writing—review and editing; J-LG: methodology, software, resources, writing—review & editing, supervision; FF: conceptualization, methodology, formal analysis, investigation, writing—original draft, writing—review and editing, supervision; AO: conceptualization, methodology, software, formal analysis, resources, data curation, writing—review & editing, supervision.

Funding INSERM UMR_S 1256, Nutrition, Genetics, and Environmental Risk Exposure (NGERE) and University Hospital of Nancy.

Availability of data and material Anonymized patient data are available for use in collaborative studies to researchers upon reasonable request. Data will be provided following the review and approval of a research proposal (including a statistical analysis plan) and the completion of a

data-sharing agreement. Responses to the request for the raw data will be judged by the IRB of the University Hospital of Nancy.

Code availability (software application or custom code) Not applicable.

Declarations

Conflict of interest The authors who have taken part in this study declare that they do not have anything to disclose regarding conflicts of interest concerning this manuscript.

Ethics approval The Ethics Committee of the University Hospital of Nancy approved the study.

Consent to participate (include appropriate statements) Not applicable.

Consent for publication (include appropriate statements) Not applicable.

References

- Adams DR, Eng CM (2018) Next-generation sequencing to diagnose suspected genetic disorders. *N Engl J Med* 379:1353–1362. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1711801>
- Amberger JS, Bocchini CA, Scott AF, Hamosh A (2019) OMIM.org: leveraging knowledge across phenotype-gene relationships. *Nucleic Acids Res* 47:D1038–D1043. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1151>
- Anikster Y, Haack TB, Vilboux T, Pode-Shakked B, Thony B, Shen N, Guarani V, Meissner T, Mayatepek E, Trefz FK, Marek-Yagel D, Martinez A, Huttlin EL, Paulo JA, Berutti R, Benoist JF, Imbard A, Dorboz I, Heimer G, Landau Y, Ziv-Strasser L, Malicdan MCV, Gemperle-Britschgi C, Cremer K, Engels H, Meili D, Keller I, Bruggmann R, Strom TM, Meitinger T, Mullikin JC, Schwartz G, Ben-Zeev B, Gahl WA, Harper JW, Blau N, Hoffmann GF, Prokisch H, Opladen T, Schiff M (2017) Biallelic mutations in DNAJC12 cause hyperphenylalaninemia, dystonia, and intellectual disability. *Am J Hum Genet* 100:257–266. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2017.01.002>
- Australian Genomics Health Alliance Acute Care F, Lunke S, Eggers S, Wilson M, Patel C, Barnett CP, Pinner J, Sandaradura SA, Buckley MF, Krzesinski EI, de Silva MG, Brett GR, Boggs K, Mowat D, Kirk EP, Ades LC, Akesson LS, Amor DJ, Ayres S, Baxendale A, Borrie S, Bray A, Brown NJ, Chan CY, Chong B, Cliffe C, Delatycki MB, Edwards M, Elakis G, Fahey MC, Fennell A, Fowles L, Gallacher L, Higgins M, Howell KB, Hunt L, Hunter MF, Jones KJ, King S, Kumble S, Lang S, Le Moing M, Ma A, Phelan D, Quinn MCJ, Richards A, Richmond CM, Riseley J, Rodgers J, Suchdev R, Sadedin S, Schlapbach LJ, Smith J, Springer A, Tan NB, Tan TY, Temple SL, Theda C, Vasudevan A, White SM, Yeung A, Zhu Y, Martyn M, Best S, Roscioli T, Christodoulou J, Stark Z (2020) Feasibility of ultra-rapid exome sequencing in critically ill infants and children with suspected monogenic conditions in the Australian public health care system. *JAMA* 323:2503–2511. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.7671>
- Churdon JW, Smith AC, Woulfe J, Pena E, Rakkhara K, Dennis C, Beau-liu C, Huang L, Schwartzentruber J, Hawkins C, Harms MB, Dojeji S, Zhang M, Consortium FC, Majewski J, Bulman DE, Boycott KM, Dymant DA (2015) LIMS2 mutations are associated with a novel muscular dystrophy, severe cardiomyopathy and triangular tongues. *Clin Genet* 88: 558–564. <https://doi.org/10.1111/cgc.12561>
- Chérot E, Keren B, Dubourg C, Carré W, Fradin M, Lavillaureix A, Afenjar A, Burglen L, Whalen S, Charles P, Marey I, Heide S, Jacquette A, Heron D, Doummar D, Rodriguez D, Billete de Villemeur T, Moutard ML, Guët A, Xavier J, Périssé D, Cohen D, Demurger F, Quélin C, Depienne C, Odent S, Nava C, David V, Pasquier L, Mignot C (2018) Using medical exome sequencing to identify the causes of neurodevelopmental disorders: experience of 2 clinical units and 216 patients. *Clin Genet* 93:567–576. <https://doi.org/10.1111/cgc.13102>
- Choi Y, Chan AP (2015) PROVEAN web server: a tool to predict the functional effect of amino acid substitutions and indels. *Bioinformatics* 31:2745–2747. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv195>
- Cossins J, Belaya K, Hicks D, Salih MA, Finlayson S, Carboni N, Liu WW, Maxwell S, Zoltowska K, Farsani GT, Laval S, Seidhamed MZ, Consortium WGS, Donnelly P, Bentley D, McGowan SJ, Muller J, Palace J, Lochmuller H, Beeson D (2013) Congenital myasthenic syndromes due to mutations in ALG2 and ALG14. *Brain* 136: 944–956. <https://doi.org/10.1093/brain/awt010>
- de Ligt J, Willemsen MH, van Bon BW, Kleefstra T, Yntema HG, Kroes T, Vulto-van Silfhout AT, Koolen DA, de Vries P, Gilissen C, del Rosario M, Hoischen A, Scheffer H, de Vries BB, Brunner HG, Veltman JA, Vissers LE (2012) Diagnostic exome sequencing in persons with severe intellectual disability. *N Engl J Med* 367:1921–1929. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1206524>
- Deciphering Developmental Disorders S (2015) Large-scale discovery of novel genetic causes of developmental disorders. *Nature* 519:223–228. <https://doi.org/10.1038/nature14135>
- Dewey FE, Grove ME, Pan C, Goldstein BA, Bernstein JA, Chaib H, Merker JD, Goldfeder RL, Enns GM, David SP, Pakdaman N, Ormond KE, Caleshu C, Kingham K, Klein TE, Whirl-Carrillo M, Sakamoto K, Wheeler MT, Butte AJ, Ford JM, Boxer L, Ioannidis JP, Yeung AC, Altman RB, Assimes TL, Snyder N, Ashley EA, Quertemous T (2014) Clinical interpretation and implications of whole-genome sequencing. *JAMA* 311:1035–1045. <https://doi.org/10.1001/jama.2014.1717>
- Dong C, Wei P, Jian X, Gibbs R, Boerwinkle E, Wang K, Liu X (2015) Comparison and integration of deleteriousness prediction methods for nonsynonymous SNVs in whole exome sequencing studies. *Hum Mol Genet* 24:2125–2137. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu733>
- Fukao T, Nakamura K (2019) Advances in inborn errors of metabolism. *J Hum Genet* 64:65. <https://doi.org/10.1038/s10038-018-0535-7>
- Ganapathy A, Mishra A, Soni MR, Kumar P, Sadagopun M, Kanthi AV, Patric IRP, George S, Sridharan A, Thyagarajan TC, Aswathy SL, Vidya HK, Chinnappa SM, Nayunala S, Prakash MB, Raghavendrachar VG, Parulekar M, Gowda VK, Nampoothiri S, Menon RN, Pachat D, Udani V, Naik N, Kamate M, Devi ARR, Mohammed Kunju PA, Nair M, Hegde AU, Kumar MP, Sundaram S, Tilak P, Puri RD, Shah K, Sheth J, Hasan Q, Sheth F, Agrawal P, Katragadda S, Veeramachaneni V, Chandru V, Hariharan R, Mannan AU (2019) Multi-gene testing in neurological disorders showed an improved diagnostic yield: data from over 1000 Indian patients. *J Neurol* 266:1919–1926. <https://doi.org/10.1007/s00415-019-09358-1>
- Groopman EE, Marasa M, Cameron-Christie S, Petrovski S, Aggarwal VS, Milo-Rasouly H, Li Y, Zhang J, Nestor J, Krithivasan P, Lam WY, Mitroiti A, Piva S, Kil BH, Chatterjee D, Reingold R, Bradbury D, DiVecchia M, Snyder H, Mu X, Mehl K, Baldères O, Fasel DA, Weng C, Radhakrishnan J, Canetta P, Appel GB, Bomback AS, Ahn W, Uy NS, Alam S, Cohen DJ, Crew RJ, Dube GK, Rao MK, Kamalakaran S, Copeland B, Ren Z, Bridgers J, Malone CD, Mebane CM, Dagaonkar N, Fellström BC, Haefliger C, Mohan S, Sanna-Cherchi S, Kiryluk K, Fleckner J, March R,

- Platt A, Goldstein DB, Gharavi AG (2019) Diagnostic utility of exome sequencing for kidney disease. *N Engl J Med* 380:142–151. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1806891>
- Gueant JL, Chery C, Oussalah A, Nadaf J, Coelho D, Josse T, Flayac J, Robert A, Kosciński I, Gastin I, Filhine-Tresarrieu P, Pupa-vac M, Brebner S, Watkins D, Pastinen T, Montpetit A, Hariri F, Tregouet D, Raby BA, Chung WK, Morange PE, Froese DS, Baumgartner MR, Benoist JF, Ficicioglu C, Marchand V, Motorin Y, Bonnemains C, Feillet F, Majewski J, Rosenblatt DS (2018) APRDX1 mutant allele causes a MMACHC secondary epimutation in cblc patients. *Nat Commun* 9:67. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02306-5>
- Haack TB, Danhauser K, Haberberger B, Hoser J, Strecker V, Boehm D, Uziel G, Lamantea E, Invernizzi F, Poulton J, Rolinski B, Iuso A, Biskup S, Schmidt T, Mewes HW, Wittig I, Meitinger T, Zeviani M, Prokisch H (2010) Exome sequencing identifies ACAD9 mutations as a cause of complex I deficiency. *Nat Genet* 42:1131–1134. <https://doi.org/10.1038/ng.706>
- Harrispaul R, Vasli N, Mikhailov A, Rafiq MA, Mittal K, Windpassinger C, Sheikh TI, Noor A, Mahmood H, Downey S, Johnson M, Vleuten K, Bell L, Ilyas M, Khan FS, Khan V, Moradi M, Ayaz M, Naeem F, Heidari A, Ahmed I, Ghadami S, Agha Z, Zeinali S, Qamar R, Mozdehpanah H, John P, Mir A, Ansar M, French L, Ayub M, Vincent JB (2018) Mapping autosomal recessive intellectual disability: combined microarray and exome sequencing identifies 26 novel candidate genes in 192 consanguineous families. *Mol Psychiatry* 23:973–984. <https://doi.org/10.1038/mp.2017.60>
- Kirk EP, Barlow-Stewart K, Selvanathan A, Joseph-Taylor S, Worgan L, Rajagopalan S, Cowley MJ, Gayevskiy V, Birtles A, Burnett L, Elakis G, Lo W, Buckley M, Colley A, Roscioli T (2019) Beyond the panel: preconception screening in consanguineous couples using the TruSight One “clinical exome.” *Genet Med* 21:608–612. <https://doi.org/10.1038/s41436-018-0082-9>
- Kumar P, Henikoff S, Ng PC (2009) Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat Protoc* 4:1073–1081. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.86>
- Landrum MJ, Lee JM, Benson M, Brown GR, Chao C, Chitipiralla S, Gu B, Hart J, Hoffman D, Jang W, Karapetyan K, Katz K, Liu C, Maddipati Z, Malheiro A, McDaniel K, Ovetzky M, Riley G, Zhou G, Holmes JB, Kattman BL, Maglott DR (2018) ClinVar: improving access to variant interpretations and supporting evidence. *Nucleic Acids Res* 46:D1062–D1067. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1153>
- Lee H, Deignan JL, Dorrani N, Strom SP, Kantarci S, Quintero-Rivera F, Das K, Toy T, Harry B, Yourshaw M, Fox M, Fogel BL, Martinez-Agosto JA, Wong DA, Chang VY, Shieh PB, Palmer CG, Dipple KM, Grody WW, Vilain E, Nelson SF (2014) Clinical exome sequencing for genetic identification of rare Mendelian disorders. *JAMA* 312:1880–1887. <https://doi.org/10.1001/jama.2014.14604>
- Lionel AC, Costain G, Monfared N, Walker S, Reuter MS, Hosseini SM, Thiruvahindrapuram B, Merico D, Jobling R, Nalpathamkalam T, Pellecchia G, Sung WWL, Wang Z, Bikangaga P, Boelman C, Carter MT, Malheiro D, Cytrynbaum C, Dell SD, Dhir P, Dowling JJ, Heon H, Hewson S, Hiraki I, Inbar-Feigenberg M, Klatt R, Kronick J, Laxer RM, Licht C, MacDonald H, Mercimek-Andrews S, Mendoza-Londono R, Piscione T, Schneider R, Schulze A, Silverman E, Siriwardena K, Snead OC, Sondheimer N, Sutherland J, Vincent A, Wasserman JD, Weksberg R, Shuman C, Carew C, Szego MJ, Hayeems RZ, Basran R, Stavropoulos DJ, Ray PN, Bowdin S, Meyn MS, Cohn RD, Scherer SW, Marshall CR (2018) Improved diagnostic yield compared with targeted gene sequencing panels suggests a role for whole-genome sequencing as a first-tier genetic test. *Genet Med* 20:435–443. <https://doi.org/10.1038/gim.2017.119>
- Loed J, McMullan DJ, Eberhardt RY, Rinck G, Hamilton SJ, Quinlan-Jones E, Prigmore E, Keelagher R, Best SK, Carey GK, Mellis R, Robert S, Berry IR, Chandler KE, Cilliers D, Cresswell L, Edwards SL, Gardiner C, Henderson A, Holden ST, Homfray T, Lester T, Lewis RA, Newbury-Ecob R, Prescott K, Quarrell OW, Ramsden SC, Roberts E, Tapon D, Tooley MJ, Vasudevan PC, Weber AP, Wellesley DG, Westwood P, White H, Parker M, Williams D, Jenkins L, Scott RH, Kilby MD, Chitty LS, Hurler ME, Maher ER (2019) Prenatal exome sequencing analysis in fetal structural anomalies detected by ultrasonography (PAGE): a cohort study. *Lancet* 393:747–757. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(18\)31940-8](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(18)31940-8)
- Lupski JR, Reid JG, Gonzaga-Jauregui C, Rio Deiros D, Chen DC, Nazareth L, Bainbridge M, Dinh H, Jing C, Wheeler DA, McGuire AL, Zhang F, Stankiewicz P, Halperin JJ, Yang C, Gehman C, Guo D, Irikat RK, Tom W, Fantin NJ, Muzny DM, Gibbs RA (2010) Whole-genome sequencing in a patient with Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *N Engl J Med* 362:1181–1191. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0908094>
- Madhuri V, Selina A, Loganathan L, Kumar A, Kumar V, Raymond R, Ramesh S, Vincy N, Joel G, James D, Kandagaddala M (2021) Osteogenesis imperfecta: novel genetic variants and clinical observations from a clinical exome study of 54 Indian patients. *Ann Hum Genet* 85:37–46. <https://doi.org/10.1111/ahg.12403>
- Marques Matos C, Alonso I, Leao M (2019) Diagnostic yield of next-generation sequencing applied to neurological disorders. *J Clin Neurosci* 67:14–18. <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2019.06.041>
- Meng L, Pammil M, Saronwala A, Magoulas P, Ghazi AR, Vetrini F, Zhang J, He W, Dharmadhikari AV, Qu C, Ward P, Braxton A, Narayanan S, Ge X, Tokita MJ, Santiago-Sim T, Dai H, Chiang T, Smith H, Azamian MS, Robak L, Bostwick BL, Schaaf CP, Potocki L, Scaglia F, Bacino CA, Hanchard NA, Wangler MF, Scott D, Brown C, Hu J, Belmont JW, Burrage LC, Graham BH, Sutton VR, Craig WJ, Plon SE, Lupski JR, Beaudet AL, Gibbs RA, Muzny DM, Miller MJ, Wang X, Leduc MS, Xiao R, Liu P, Shaw C, Walkiewicz M, Bi W, Xia F, Lee B, Eng CM, Yang Y, Lalani SR (2017) Use of exome sequencing for infants in intensive care units: ascertainment of severe single-gene disorders and effect on medical management. *JAMA Pediatr* 171:e173438. <https://doi.org/10.1001/jamapediatrics.2017.3438>
- Nguengang Wakap S, Lambert DM, Oly A, Rodwell C, Gueydan C, Lanneau V, Murphy D, Le Cam Y, Rath A (2020) Estimating cumulative point prevalence of rare diseases: analysis of the Orphanet database. *Eur J Hum Genet* 28:165–173. <https://doi.org/10.1038/s41431-019-0508-0>
- Oussalah A, Jeannesson-Thivisol E, Chery C, Perrin P, Rouyer P, Josse T, Cano A, Barth M, Foulhoux A, Mention K, Labarthe F, Arnoux JB, Maillot F, Lenaerts C, Damesnil C, Wagner K, Terral D, Broue P, De Parscau L, Gay C, Kuster A, Bedu A, Besson G, Lamireau D, Odent S, Masurel A, Rodriguez-Gueant RM, Feillet F, Gueant JL, Namour F (2020) Population and evolutionary genetics of the PAH locus to uncover overdominance and adaptive mechanisms in phenylketonuria: results from a multiethnic study. *EBioMedicine* 51:102623. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.102623>
- Petrovski S, Aggarwal V, Giordano JL, Stosic M, Wou K, Bier L, Spiegel E, Brennan K, Stong N, Jobanputra V, Ren Z, Zhu X, Mebane C, Nahum O, Wang Q, Kamalakaran S, Malone C, Anyane-Yeboah K, Miller R, Levy B, Goldstein DB, Wapner RJ (2019) Whole-exome sequencing in the evaluation of fetal structural anomalies: a prospective cohort study. *Lancet* 393:758–767. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(18\)32042-7](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(18)32042-7)

- Quang D, Chen Y, Xie X (2015) DANN: a deep learning approach for annotating the pathogenicity of genetic variants. *Bioinformatics* 31:761–763. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu703>
- Rauch A, Wieczorek D, Graf E, Wieland T, Ende S, Schwarzmayr T, Albrecht B, Bartholdi D, Beygo J, Di Donato N, Dufke A, Cremer K, Hempel M, Horn D, Hoyer J, Joset P, Röpke A, Moog U, Riess A, Thiel CT, Tzschach A, Wiesener A, Wohlleber E, Zweier C, Ekici AB, Zink AM, Rump A, Meisinger C, Grallert H, Sticht H, Schenck A, Engels H, Rappold G, Schröck E, Wieacker P, Riess O, McIntinger T, Reis A, Strom TM (2012) Range of genetic mutations associated with severe non-syndromic sporadic intellectual disability: an exome sequencing study. *Lancet* 380:1674–1682. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(12\)61480-9](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(12)61480-9)
- Renard E, Chery C, Oussalah A, Josse T, Perrin P, Tramoy D, Voirin J, Klein O, Leheup B, Feillet F, Gueant-Rodríguez RM, Gueant JL (2019) Exome sequencing of cases with neural tube defects identifies candidate genes involved in one-carbon/vitamin B12 metabolisms and Sonic Hedgehog pathway. *Hum Genet* 138:703–713. <https://doi.org/10.1007/s00439-019-02015-7>
- Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E, Voelkerding K, Rehm HL, Committee ALQA (2015) Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* 17:405–424. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.30>
- Saudubray JM, Garcia-Cazorla A (2018) Inborn errors of metabolism overview: pathophysiology, manifestations, evaluation, and management. *Pediatr Clin North Am* 65:179–208. <https://doi.org/10.1016/j.pcl.2017.11.002>
- Schwarz JM, Cooper DN, Schuelke M, Seelow D (2014) Mutation-Taster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nat Methods* 11:361–362. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2890>
- Shihab HA, Gough J, Cooper DN, Stenson PD, Barker GL, Edwards KJ, Day IN, Gaunt TR (2013) Predicting the functional, molecular, and phenotypic consequences of amino acid substitutions using hidden Markov models. *Hum Mutat* 34:57–65. <https://doi.org/10.1002/humu.22225>
- Singleton MV, Guthery SL, Voelkerding KV, Chen K, Kennedy B, Margraf RL, Durtschi J, Eilbeck K, Reese MG, Jorde LB, Huff CD, Yandell M (2014) Phevor combines multiple biomedical ontologies for accurate identification of disease-causing alleles in single individuals and small nuclear families. *Am J Hum Genet* 94:599–610. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2014.03.010>
- Sparks TN, Lianoglou BR, Adami RR, Pluym ID, Holliman K, Duffy J, Downum SL, Patel S, Faubel A, Boe NM, Field NT, Murphy A, Laurent LC, Jolley J, Uy C, Slavotinek AM, Devine P, Hodoglugil U, Van Ziffle J, Sanders SJ, MacKenzie TC, Norton ME (2020) Exome sequencing for prenatal diagnosis in nonimmune hydrops fetalis. *N Engl J Med* 383:1746–1756. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2023643>
- Tarailo-Graovac M, Shyr C, Ross CJ, Horvath GA, Salvarinova R, Ye XC, Zhang LH, Bhavsar AP, Lee JJ, Drögemöller BI, Abdelsayed M, Alfidhel M, Armstrong L, Baumgartner MR, Burda P, Connolly MB, Cameron J, Demos M, Dewan T, Dionne J, Evans AM, Friedman JM, Garber I, Lewis S, Ling J, Mandal R, Mattman A, McKinnon M, Michoulas A, Metzger D, Ogunbayo OA, Rakic B, Rozmus J, Ruben P, Sayson B, Santra S, Schultz KR, Selby K, Shekel P, Sirrs S, Skrypnik C, Superti-Furga A, Turvey SE, Van Allen MI, Wishart D, Wu J, Wu J, Zafeiriou D, Kluijtmans L, Wevers RA, Eydoux P, Lehman AM, Vallance H, Stockler-Ipsiroglu S, Sinclair G, Wasserman WW, van Karnebeek CD (2016) Exome sequencing and the management of neurometabolic disorders. *N Engl J Med* 374:2246–2255. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1515792>
- Taylor RW, Pyle A, Griffin H, Blakely EL, Duff J, He L, Smertenko T, Alston CL, Neeve VC, Best A, Yarham JW, Kirschner J, Schara U, Talim B, Topaloglu H, Baric I, Holinski-Feder E, Abicht A, Czermin B, Kleinle S, Morris AA, Vassallo G, Gorman GS, Ramesh V, Turnbull DM, Santibanez-Koref M, McFarland R, Horvath R, Chinnery PF (2014) Use of whole-exome sequencing to determine the genetic basis of multiple mitochondrial respiratory chain complex deficiencies. *JAMA* 312:68–77. <https://doi.org/10.1001/jama.2014.7184>
- Van der Auwera GA, Carneiro MO, Hartl C, Poplin R, Del Angel G, Levy-Moonshine A, Jordan T, Shaker K, Roazen D, Thibault J, Banks E, Garimella KV, Altshuler D, Gabriel S, DePristo MA (2013) From FastQ data to high confidence variant calls: the Genome Analysis Toolkit best practices pipeline. *Curr Protoc Bioinform* 43:11101–111033. <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi1110s43>
- Vega AI, Medrano C, Navarrete R, Desviat LR, Merinero B, Rodríguez-Pombo P, Vitoria I, Ugarte M, Pérez-Cerdá C, Pérez B (2016) Molecular diagnosis of glycogen storage disease and disorders with overlapping clinical symptoms by massive parallel sequencing. *Genet Med* 18:1037–1043. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.217>
- Vernon HJ (2015) Inborn errors of metabolism: advances in diagnosis and therapy. *JAMA Pediatr* 169:778–782. <https://doi.org/10.1001/jamapediatrics.2015.0754>
- Visser LE, de Ligt J, Gilissen C, Janssen I, Stehouwer M, de Vries P, van Lier B, Arts P, Wierskamp N, del Rosario M, van Bon BW, Hoischen A, de Vries BB, Brunner HG, Veltman JA (2010) A de novo paradigm for mental retardation. *Nat Genet* 42:1109–1112. <https://doi.org/10.1038/ng.712>
- Wiedemann A, Chery C, Coelho D, Flayac J, Gueguen N, Desquiere-Dumas V, Feillet F, Lavigne C, Neau JP, Fowler B, Baumgartner MR, Reynier P, Gueant JL, Oussalah A (2020) Mutations in MTHFR and POLG impaired activity of the mitochondrial respiratory chain in 46-year-old twins with spastic paraparesis. *J Hum Genet* 65:91–98. <https://doi.org/10.1038/s10038-019-0689-y>
- Wu L, Brady L, Shoffner J, Tarnopolsky MA (2018) Next-generation sequencing to diagnose muscular dystrophy, rhabdomyolysis, and HyperCKemia. *Can J Neurol Sci* 45:262–268. <https://doi.org/10.1017/cjn.2017.286>
- Yang Y, Muzny DM, Reid JG, Bainbridge MN, Willis A, Ward PA, Braxton A, Beuten J, Xia F, Niu Z, Hardison M, Person R, Bekheirnia MR, Ledue MS, Kirby A, Pham P, Scull J, Wang M, Ding Y, Plon SE, Lupski JR, Beaudet AL, Gibbs RA, Eng CM (2013) Clinical whole-exome sequencing for the diagnosis of mendelian disorders. *N Engl J Med* 369:1502–1511. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1306555>
- Yubero D, Brandi N, Ormazabal A, Garcia-Cazorla A, Perez-Duenas B, Campistol J, Ribes A, Palau F, Artuch R, Armstrong J, Working G (2016) Targeted next generation sequencing in patients with inborn errors of metabolism. *PLoS ONE* 11:e0156359. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156359>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

6.3 Etude n3 - PTM – soumis E-Biomedecine (IF 11.205)

Manuscript

[Click here to view linked References](#) 

1

The altered expression and posttranslational modifications of enzymes involved in energy and amino acid metabolism contribute to the clinical and metabolic variability of *cbIC/epicbIC* types of inborn errors of cobalamin metabolism

Arnaud Wiedemann^{1,2}, Abderrahim Oussalah^{1,2}, Rosa-Maria Guéant Rodriguez^{1,2}, Elise Jeannesson^{1,2}, Marc Mertens², Irina Rotaru^{1,2}, Jean-Marc Alberto¹, Okan Baspinar¹, Charif Rashka¹, Ziad Hassan¹, Guillaume Chevreux³, Laurent Lignièrès³, Jean-Michel Camadro³, François Feillet^{1,2}, David Coelho^{1,2}, Jean-Louis Guéant^{1,2}

1 Inserm UMRS 1256 NGERE – Nutrition, Genetics, and Environmental Risk Exposure, University of Lorraine, Nancy F-54000, France.

2 National Center of Inborn Errors of Metabolism, University Regional Hospital Center of Nancy, Nancy F-54000, France.

3 Université Paris Cité, CNRS, Institut Jacques Monod, F-75013 Paris, France

* Correspondence to:

Prof. Jean-Louis Guéant, Inserm-UL U1256 – NGERE, Faculté de Médecine, Bâtiment C 2ème étage, 9 Avenue de la Forêt de Haye, 54505 Vandœuvre-lès-Nancy, France. jean-louis.gueant@univ-lorraine.fr

Abstract

The high variability in clinical and metabolic presentations of inborn errors of cobalamin (*cbl*) metabolism (IECM), such as the *cbIC/epicbIC* types with combined deficits in methylmalonyl-coA mutase (MUT) and methionine synthase (MS), are not well understood. However, they could be explained by the impaired expression/activity of enzymes from other metabolic pathways. To address this issue, we performed metabolomic, genomic, proteomic, and posttranslational modification (PTM) analyses in fibroblasts from three *cbIC* cases and one *epicbIC* case and compared these with fibroblasts from three *cbIG* cases with specific MS deficits and control fibroblasts. *CbIC* patients had metabolic profilings consistent with altered urea cycle, glycine, and energy mitochondrial metabolism. Metabolomic analysis showed partial disruption and increased glutamate/ketoglutarate anaplerotic pathway of the tricarboxylic acid cycle (TCA), in patient fibroblasts. RNA-seq analysis showed decreases in the expression of *MT-TT* (mitochondrial tRNA threonine), *MT-TP* (mitochondrial tRNA proline), *OXCT1* (succinyl CoA:3-oxoacid CoA transferase deficiency), and *MT-CO1* (cytochrome C oxidase subunit 1). Proteomic changes were also observed for key mitochondrial enzymes, including NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit A8 (NDUFA8), carnitine palmitoyltransferase 2 (CPT2), and ubiquinol-cytochrome C reductase, complex III subunit X (UQCR10). Propionaldehyde addition in ornithine aminotransferase was the predominant PTM in *cbIC* cells and could be related with the dramatic cellular increase in propionate and methylglyoxalate. It is consistent with the decreased concentration of ornithine reported in 3 *cbIC* cases. The expected clinical outcomes of these multi-omic expression alterations include peripheral and central neuropathy, cardiomyopathy, pulmonary hypertension, development delay, and hypotonia, which are also reported for the *cbIC* and *cbIG* types of IECM. In conclusion, the omics-related effects of IECM on other enzymes and metabolic pathways are consistent with the diversity and variability of their age-related metabolic and clinical manifestations. PTMs are expected to produce cumulative effects, which could explain the influence of age on neurological manifestations.

Keywords: Inborn errors of metabolism; methylmalonyl-CoA mutase; methionine synthase, MMACHC; vitamin B12 deficiency; one-carbon metabolism

1. Introduction

In humans, vitamin B₁₂ (cobalamin, Cbl) is the cofactor for two enzymes, methionine synthase (MS, encoded by *MTR*) and methylmalonyl-CoA mutase (MUT, encoded by *MMUT*)¹. MS requires methylcobalamin (MeCbl) and methyltetrahydrofolate (MeTHF) for the remethylation of homocysteine (Hcy) into methionine. MS reductase (MSR, encoded by *MTRR*) maintains MS activity through the reactivation of oxidized Cbl². MUT requires adenosylcobalamin (AdoCbl) as a cofactor to catalyze the conversion of L-methylmalonyl-CoA to succinyl-CoA. The inborn errors of cellular Cbl metabolism (IECM) result from genetic defects of the transport and target enzymes of Cbl. They are usually classified as groups cblA-J by somatic cell complementation.

IECM with selectively decreased methionine synthase activity (Hcy-IECM) leads to increased Hcy and decreases in the synthesis of methionine and adenosylmethionine, which is the universal methyl-donor needed in the transmethylation of DNA, histones, and other proteins, and small molecules in mammals². Hcy-IECM includes complementation groups cblG and cblE, with mutations in *MTR* and *MTRR*, respectively. IECM with selectively decreased MUT activity (MMA-IECM) leads to the accumulation of the L-methylmalonyl-CoA derivative methylmalonic acid (MMA) and decreased synthesis of succinyl-CoA, which is a metabolite of the tricarboxylic acid cycle (TCA). The MUT reaction is the final step of the anaplerotic replenishment of the TCA cycle by the catabolism of branched-chain amino acids, odd-chain fatty acids, and the side chain of cholesterol³. These disorders are caused by mutations in *MMUT*, *MMAB* (*cblB*), which is needed for the synthesis of AdoCbl, *MMAA* (*cblA*), which is responsible for AdoCbl incorporation into MUT, and genes encoding methylmalonyl-CoA epimerase (*MCEE*) or succinate-CoA ligase (*SUCLG1*, *SUCLA2*). IECM with a combined deficit in MS and MUT activities (combined IECM, abbreviated C-IECM) includes disorders of Cbl intracellular transport that impair cellular availability in both MeCbl and AdoCbl and therefore the remethylation and mitochondrial pathways. These intracellular disorders (complementation groups cblC-J) are produced by mutations in genes that encode two lysosomal transporters, *LMBD1* (*cblF*) and *ABCD4* (*cblJ*), and two cytoplasmic proteins, *MMACHC* (*cblC*) and *MMADHC* (*cblD*). C-IECM combines the metabolic consequences of impaired MS and MUT activities.

IECM with hyperhomocysteinemia (Hcy-IECM) is very rare. These patients present with megaloblastic anemia or macrocytosis and neurological manifestations, with lethargy, feeding difficulties, vomiting, mental retardation, seizures, ataxia, and cerebral atrophy during the first year of life^{4,5}. Neurological outcomes and brain atrophy are more prevalent later in life. Most MMA-IECM patients have early manifestations, including metabolic crisis, growth and development retardation, hypotonia, epilepsy, and decreased glomerular filtration. Death and acute metabolic decompensation are frequently reported in the first year of life but can also occur later. They are related to brain edema due to hyperammonemia⁶. In contrast, C-IECM may present with different subsets of clinical presentations according to age and type. The frequency of manifestations is mainly documented in the cblC-type, which is the most frequent IECM. Early manifestations include megaloblastic anemia, acute neurological deterioration, hydrocephalus, demyelination, confusion, mild mental retardation, cardiomyopathy with noncompaction, pulmonary hypertension, retinopathy, hemolytic uremic syndrome, and liver steatosis. Ataxia, peripheral neuropathy, and thromboembolic manifestations become more prevalent later in life. Severe and sometimes lethal decompensation has been reported in several cases in the first year of life. Ophthalmological manifestations are mainly reported in cblC (early onset retinopathy) and in MMUT (optic atrophy starting in the second decade) and sporadically in other IECMs^{4,6,7}.

The mechanisms at the origin of the high variability of clinical presentations and responses to therapy of C-IECM and Hcy-IECM are not well understood. Some mechanisms have been examined by our group and other groups in recent years. We have shown in patient cells and animal models that impaired MS activity leads to the development of ER stress and decreased expression of cytosolic SIRT1 and mitochondrial SIRT3². The impaired synthesis of SAM and sirtuin activities alters mitochondrial energy metabolism through the inactivation of nuclear receptors through the dissociation of PPAR- α , ER- α , ERR- α , and HNF-4 α receptors from their coactivator PGC-1 α ^{2,4}. The imbalanced methylation and phosphorylation of RNA binding proteins produce an altered splicing and nucleo-cytoplasmic shuttling of mRNAs and RNA binding proteins and a subsequently altered expression of genes involved in energy metabolism, neuroplasticity, and brain development, including in the optic area^{2,8,9}.

Taken together, the dramatic genomic alterations observed in cells and animal models of C-IECM and Hcy-IECM led us to hypothesize that the clinical variability of the deficits in MS and/or MUT activities could be explained by the invalidation of functional proteins and key

enzymes involved in other metabolic pathways through genomic, translational and posttranslational specific mechanisms. To address this issue, we performed in-depth metabolic, genomic, and proteomic (including PTM) phenotyping of fibroblasts from three cbIC cases and one epi-cbIC case and compared these phenotypes to those of control and cbIG fibroblasts. Additionally, we analyzed the results according to genes related to other inherited metabolic disorders and investigated whether they produce clinical outcomes similar to the clinical and metabolic IECM presentations recently reported in an in silico database of 824 patients with a genetically proven diagnosis¹⁰.

2. Methods

2.1. *Patient, patient-derived fibroblasts, and cell culture.*

The patients (3 *cbIC*, 1 *epi-cbIC*) were followed in the Reference Center for Inherited Metabolic Diseases of the University Hospital of Nancy. Their clinical and metabolic outcomes were compared to those from 3 MMA-IEMCs recruited in our center and to the classic outcomes reported for *cbIG* and other inborn errors of metabolism, including urea cycle disorders, fatty acid β -oxidation deficiency and hyperglycemia with glycine decarboxylase deficiency. Omic phenotyping was performed in fibroblasts from three other *cbIC* cases and the *epi-cbIC* case described before, and compared to fibroblasts from 3 *cbIG* cases and one control. Patient fibroblasts were obtained by skin biopsy during their follow-up. Cell culture was also performed with control lines. All cell lines were of Caucasian descent. Cells were used between passages 10 and 15 and tested negative for mycoplasma infection. Cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) with 4500 mg/L glucose (Sigma Aldrich, D5796) supplemented with 10% fetal calf serum (Eurobio, CVFSVF0001), 1% sodium pyruvate (Sigma Aldrich, S8636), and 1% penicillin–streptomycin (Sigma Aldrich, P4333) and incubated at 37 °C and 5% CO₂ until confluent. The culture medium was changed every three days.

2.2. *Transcriptomics analyses by RNA-Seq.*

Cells were trypsinized. Then, total RNA was isolated from the cell pellet using the RNeasyTM mini kit extraction (Qiagen) and treated with DNase I (Ambion, AM1906). The RNA quality was assessed by using the 2100 Bioanalyzer (Agilent). RNA-Seq libraries were

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

2.3. *Proteomics analyses.*

The proteomic analyses performed by nano- LC/MSMS coupled to an Orbitrap Fusion ETD mass spectrometer were obtained as described in supplementary table 8 from ref [9]. Total proteins were extracted from the cell pellet using RIPA lysis buffers. The protein suspension was placed in an ultrasound bath for 30 min followed by three freeze-thaw cycles with liquid nitrogen and a Mary bath at 37°C. The tubes were then subjected to centrifugation at 20,000g/30 min/4°C and the protein supernatant was recovered and then assayed with the BCA Assay kit (Interchim) and precipitated with acetone prior to nano- LC/MSMS analysis [9].

2.4. *Bioinformatics analyses for transcriptomics.*

Quality control of nucleotide sequences was performed using FastQC v0.11.5 (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>), and reads were mapped to the GRCh38 genome by HISAT2 v2.0.4¹¹. Differentially spliced transcripts were assembled from the alignments obtained with Stringtie v1.3.3b¹² to identify new isoforms and isoforms already known from the reference genome GRCh38. Data were adjusted more precisely with the trimmed means of M-values (TMM) standardization method¹³. Then, they were transformed using logarithm base 2 (log₂-) and counts per million (cpm-) to track best practices for calibrating and estimating differential expressions, as previously described¹⁴. Paired-end RNA sequencing of the 24 samples generated an average of 110.2 million reads per sample. After removing the adapters and low-quality reads, reads were aligned on the hg38 reference genome. The overall alignment rate was 90.55% (sd +/- 1.86%), with an average quality of mapped reads of 99.97% (PHRED score 37.2) and an average insert size of

362.5 bp (sd +/- 621.4). Approximately 10.94% (from 9.7% to 11.4%) of reads mapped to intronic regions. A total of 55204 transcripts were reconstructed during the next step, which led to a transcriptome of 50818 unique transcripts and 16808 unique genes after filtering for very low expression against the three control samples (mean cpm value > 0.5 was considered proof of expression in the control group). Linear modeling with empirical Bayes was then applied to assess differential expression at the gene and transcript levels between the control and each patient cell line.

2.5. *Bioinformatics analysis of proteomics data to decipher PTMs.*

For PTMs analysis, MS raw files were analyzed by Peaks Online X software (build 1.6, Bioinformatics Solution Inc) using the Homo Sapiens database (SwissProt release 2022_02, 20377 entries). Parent mass tolerance was set to 10 ppm with fragment mass tolerance to 0.5 Da. Specific tryptic cleavage was selected and a maximum of 2 missed cleavage was authorized. Half a disulfide bridge (C) was set as fixed modification. Oxidation (M), deamidation (NQ) and acylations (acetylation (K), benzoyl (K), butyryl (K), crotonaldehyde (K), crotonylation (K), glutarylation (K), malonylation (K), myristoylation (K), palmitoylation (K), propionaldehyde (H, K), propionylation (K), succinylation (K)) were set as possible variable modifications. The maximum number of variable modifications per peptide was limited to 3. Identifications were filtered based on a 1% FDR (False Discovery Rate) threshold at both peptide and protein groups levels. Match between runs was performed with mass error tolerance of 20 ppm and with the autodetect retention time shift tolerance. Multivariate statistics on protein measurements and result graphics were generated using Qlucore Omics Explorer 3.7 (Qlucore AB, Lund, SWEDEN). A positive threshold value of 1 was specified to enable a log₂ transformation of abundance data for normalization i.e. all abundance data values below the threshold will be replaced by 1 before transformation. The transformed data were finally used for statistical analysis i.e. evaluation of differentially present modified peptides between two groups using a Student's bilateral t-test and assuming equal variance between groups. A p-value better than 0.05 was used to filter differential candidates.

Gene ontology analysis for significant biological processes and molecular functions (FDR<0.05) for DEGs was performed with ShinyGO V0.76¹⁵.

3. Results

3.1. Clinical and metabolic presentations.

Among the three patients with *cbIC* disease, P1 presented first with axial hypotonia and coma with hyperammonemia in neonatal period, P2 presented, P2 presented first with neurological manifestations and cerebral atrophy during the preschool period, and P3 had deep venous thrombosis in adulthood related to a dramatic increase in homocysteine in the absence of any other risk factor. P4 had *epi-cbIC* disease and died at one month of age because of cardiac and respiratory failure due to pulmonary hypertension. The metabolic characteristics of the *cbIC* and *epi-cbIC* patients were compared to 3 MMA-IECM cases recruited in our center and to the classic metabolic presentations of Hcy-IECM of urea cycle disorders, fatty acid β -oxidation deficiency and hyperglycemia with glycine decarboxylase deficiency. The exhaustive case reports and plasma amino acid analyses before metabolic treatment are detailed in Supplementary Synopsis 1 and Supplementary Table 1.

The metabolic phenotyping of the three *cbIC* cases and the one *epi-cbIC* case showed metabolic alterations with hyperglycinemia and hyperammonemia that could reflect alterations in the TCA and urea cycles and the decarboxylation of glycine (Fig. 1). We observed low arginine blood levels in both *cbIC* patients. P1 had low ornithine blood level associated with low citrulline and arginine blood level but also hyperammonemia, high lactate blood level and increase level of C16-C18 acyl-carnitine. P2 also had a low ornithine blood level, whereas glutamine, glycine, and alanine levels were increased. P2 had a low glycine level and increased citrulline blood level. The *EpicbIC* patient had low arginine, ornithine, glutamine, and alanine blood levels. We also observed increased levels of glycine and citrulline. Some of these phenotypes shared metabolic similarities with other disorders that produce hyperammonemia and/or hyperglycinemia, including MMA-IECM, urea cycle disorders, deficits in glycine decarboxylase (GLDC) and mitochondrial respiratory chain diseases (Fig. 1). The *cbIC* and *epicbIC* cases had increased glycine levels. One of the three *cbIC* cases and the *epi-cbIC* case had increased citrulline levels. Taken together, these data showed that C-IECM can produce metabolic alterations similar to those of TCA, urea cycle and glycine metabolic disorders. We hypothesized that these similarities could be related to impaired gene expression and/or activity of related genes and enzymes.

3.2. *Metabolomics study.*

We further performed a metabolomic analysis of organic acid metabolites of the TCA and glycolysis pathways in the fibroblasts from the *cbIC* and *epi-cbIC* cases with those from the *cbIG* cases and control fibroblasts (Fig. 2). As expected, we observed a dramatically increased concentration of propionate in *cbIC* and *epi-cbIC* fibroblasts compared with control fibroblasts. This propionate accumulation is a well-known consequence of the impaired conversion of methylmalonyl CoA into succinyl CoA. We also observed a decreased concentration of citrate and fumarate, indicative of a partial disruption of the TCA. These changes were not observed in *cbIG* fibroblasts. In contrast, α -ketoglutarate was increased in *cbIG* fibroblasts compared with that in control cells (Fig. 2). We also observed a dramatically increased concentration of glyoxalate and methylglyoxal in *cbIC* and *epi-cbIC* fibroblasts compare to control (Supplementary Fig.1).

3.3. *Transcriptomics study: Identification of differentially expressed genes encoding metabolic enzymes.*

The transcriptome of *cbIC/epicbIC* cells was compared to that of control cells with 3 biological replicates of each cell line.

In *cbIC/epicbIC* cells, differential expression analysis (with a false discovery rate or FDR<0.05 and a fold change (FC)>1.5) identified 173 genes with significantly different expression patterns (89 with decreased expression and 84 with increased expression) (Fig. 3, Supplementary Table 2). Among them, 25 genes encode cellular enzymes, and 5 are associated with OMIM-annotated diseases with clinical manifestation also observed in IEM B12 (Table 1, Supplementary Fig. 2). These genes are *MT-TT* (associated with Parkinson's susceptibility and lethal infantile mitochondrial myopathy), *MT-TP* (associated with Parkinson's susceptibility and lethal infantile mitochondrial myopathy), *OXCT1* (associated with succinyl CoA:3-oxoacid CoA transferase deficiency), *ACAT2* (associated with ACAT2 deficiency) and *MT-CO1* (encodes a cytochrome C oxidase subunit).

In *cbIG* cells, differential expression analysis (FDR<0.05 and FC>1.5) identified 183 genes with significantly different expression patterns (110 overexpressed and 73 downregulated) (Supplementary Table 2). Twenty-five genes encoded enzymes, and 5 were associated with diseases with clinical manifestations also reported in IECM (Table 1). These

genes were *MT-TT*, *MT-TP*, *OXCT1*, *ACAT2*, and *NOS3*. Four genes encoding enzymes were common to both *cbIC* and *cbIG* diseases (*MT-TT*, *MT-TP*, *OXCT1*, and *ACAT2*). Monogenic-associated diseases have neurological manifestations (extrapyramidal syndrome, hypotonia, seizures, development delay), cardiomyopathy and ophthalmologic manifestations (Table 1).

We performed a gene ontology analysis that focused on genes encoding enzymes related to other inherited metabolic disorders using ShinyGO. We sorted the GO terms by decreasing fold enrichment (Fig. 4A). In *cbIC* cells, the analysis revealed an enrichment (FDR<0.05) of genes involved in the hexose catabolic process (fold enrichment (FE), 7.34), fatty acid metabolic process (FE, 3.35), monocarboxylic acid metabolic process (FE, 2.84), carboxylic acid metabolic process (FE, 2.28) and oxoacid metabolic process (FE, 2.21). KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) pathway analysis confirmed the enrichment in the expression of genes related to general metabolic pathways (FE, 1.82). The results differed from the data obtained in *cbIG* cells. In these cells, the analysis revealed an enrichment (FDR<0.05) in genes involved in the homoserine metabolic process (FE, 34.96), cysteine metabolic process (FE, 21.52), guidance of ganglion cell axons in the retina (FE, 14.72), monosaccharide metabolic process (FE, 3.21), fatty acid metabolic process (FE, 3.04), monocarboxylic acid metabolic process (FE, 2.80), and carboxylic acid metabolic process (FE, 2.60) (Fig. 4B). KEGG pathway analyses revealed statistically significant modifications of the pentose phosphate pathway (FE, 9.32), sucrose metabolism (FE, 7.99), glycolysis/gluconeogenesis (FE, 5.22), oxidative phosphorylation (FE, 3.65), Parkinson disease (FE, 3.42), Huntington disease (FE, 2.97), amyotrophic lateral sclerosis (FE, 2.89) and metabolic pathways in *cbIG* cells (FE, 2.61) (Fig. 4C).

3.4. Proteomics study: Identification of differentially expressed metabolic enzymes.

We identified 185 differentially expressed proteins (FC>1.25; *P* value<0.05) in *cbIC* cells and 147 differentially expressed proteins in *cbIG* cells (Fig. 3, Supplementary Table 4). The expression of 36 proteins was modified in both diseases (Supplementary Fig. 2).

In *cbIC* cells, 42 enzymes were significantly differentially expressed compared to the control cells. We identified 9 enzymes (Table 2) associated with monogenic diseases, whose clinical manifestations are also reported in IECM. We identified alpha-1,2-mannosyltransferase (*ALG9*), which is associated with type II congenital disorder of

glycosylation, and 3 well-known mitochondrial enzymes, NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit A8 (NDUFA8), carnitine palmitoyltransferase 2 (CPT2) and ubiquinol-cytochrome c reductase, complex III subunit X (UQCRC10), which are associated with severe mitochondrial diseases.

In *cbIG* cells, we identified 48 enzymes that were differentially expressed compared to the control cells. We identified 20 enzymes in different metabolic pathways (Table 2) that were associated with monogenic diseases with clinical manifestations also reported in IECM B12. Among these enzymes, we identified the metabolism of cobalamin-associated A (MMAA) protein, which is involved in the mitochondrial transport of B12 and associated with the *clbA* type of MMA-IECM. We also identified branched chain aminotransaminase 2 (BCAT2), and 6 mitochondrial enzymes, including carnitine palmitoyltransferase 2 (CPT2) and 5 NADH:ubiquinone oxidoreductase subunits, A8 (NDUFA8), A11 (NDUFA11), A13 (NDUFA13), A2 (NDUFA2) and NADH:ubiquinone oxidoreductase Fe-S protein 3 (NDUFS3).

Three enzymes were differentially expressed in both *cbIC* and *cbIG* cells; these enzymes were *ALG9*, *STEAP3* and *NDUFA8*.

3.5. Posttranslational modifications (PTMs).

We hypothesized that some of the metabolomic alterations, including hyperammonemia, hyperglycemia, and decreased concentrations of ornithine, could be related to PTMs of related enzymes by organic acid acylation. Consistently, we observed an increase in the covalent addition of metabolites, including propionaldehyde and acetyl, propionyl, succinyl/methylmalonic acid isomers, glutaryl and malonyl organic acids in lysine/histidine residues of key proteins of metabolic pathways, in IECM compared with control fibroblasts (Table 3). The mass spectrum sequences of peptides with significant PTM addition are presented in Fig. 5A. We identified 4 proteins (TUBB3, WASHC4, OAT, and SPTAN1) with PTMs (FC>1.25; *P value* <0.05) that were expressed in *cbIC* cells and 9 proteins (WASHC4, SF1, COL6A1, COL6A3, TTL, OAT, EZR, RPS27A, and TUBB3) that were expressed in *cbIG* cells (Supplementary Table 5 and Fig. 5A). Two proteins (ARMCX1 and OAT) had similar PTMs in both diseases (Supplementary Fig. 2).

In *cbIC* fibroblasts, we observed PTM alterations with increased propionaldehyde addition in 2 proteins, ornithine aminotransferase (OAT) and spectrin, alpha, nonerythrocytic

1, which are encoded by the *OAT* and *SPTAN1* genes, respectively. The expression deficit or activity of these proteins related to monogenic diseases produces clinical neurologic or ophthalmologic manifestations such as chorioretinal degeneration and blindness, which are also reported in C-IECM (Table 4 and Fig. 5A). Cases of neonatal onset of *OAT* deficiency report failure to thrive, development delay, and encephalopathy.

In *cbIG*, we observed PTMs in 5 proteins encoded by genes related to monogenic diseases with clinical neurologic or ophthalmologic manifestations that were also reported in IECM B12 (Table 4). Specifically, we observed propionaldehyde addition in *OAT*, collagen type VI, alpha 1 chain (*COL6A1*) and tubulin beta 3 class III (*TUBB3*) and succinyl addition in collagen type V, alpha 1 chain (*COL5A1*) (Table 4 and Fig. 5A).

These data showed the predominance of PTMs by propionaldehyde addition (Table 3) in PTMs in both *cbIC* and *cbIG* cells (Table 4 and Fig. 5B). This finding could be related with the dramatic cellular increase in propionate and methylglyoxalate. The propionyl addition in *OAT* is consistent with the decreased concentration of ornithine reported in the P1, P2 and P4 cases (Supplementary 1) and the increase in glutamine in the P1 case. Propionaldehyde addition in *OAT* was higher in *cbIC* fibroblasts than in *cbIG* fibroblasts (Fig. 5B). The principal component analysis (PCA) of the PTMs of *OAT* showed clear-cut clustering according to control, *cbIC*, and *cbIG* cells, illustrating the differences in PTMs in both IECM categories (Fig. 5C).

4. Discussion

Our study in IECM fibroblasts shows expression changes at the metabolomic, transcriptomic, proteomic and PTM levels of genes that encode enzymes involved in metabolic errors whose manifestations share similarities with IECM. These modifications impact metabolic pathways, many of which are involved in mitochondrial energy metabolism.

We observed decreased expression of critical mitochondrial energy metabolism genes at both the transcriptional and protein levels in both C-IECM and Hcy-IECM. These findings suggest that the decreased expression of these genes was related to the impaired activity of methionine synthase rather than *MUT*. Decreased SAM synthesis results in epigenetic instability with organ-specific changes in DNA methylation and epigenomic mechanisms related to disrupted RNA binding-dependent nucleocytoplasmic shuttling of mRNA and the deactivation of the PGC1 α /nuclear receptor complexes². At the transcriptional level, the most

relevant changes included the decreased expression of genes encoded by mitochondrial mtDNA, including MT-TT (encoding mitochondrial tRNA threonine), MT-TP (encoding mitochondrial tRNA proline), and MT-CO1 (encoding cytochrome C oxidase subunit 1 of respiratory complex IV) and the decreased expression of OXCT1, which encodes succinyl-CoA:3-oxoacid-CoA transferase. The altered expression of mitochondrial genes leads to neurological manifestations that are also observed in IECM, including extrapyramidal syndrome, hypotonia, seizures, development delay, cardiomyopathy, and ophthalmological manifestations. The succinyl-CoA:3-oxoacid-CoA transferase catalyzes the reversible transfer of CoA from succinyl-CoA to acetoacetate as the first step of ketone body utilization. The deficit of OXCT1 could contribute to the neurological manifestations of IECM by decreasing the production of ketones needed for fueling the energy needs of the brain. The ketone energy needs of the brain are fundamental in brain aging. The brain energy provided by glucose deficits in MCI and AD is specific to glucose; however, some degree of brain energy rescue by ketones appears to act through a mechanism by which cognitive outcomes improve with ketogenic interventions in both MCI and AD¹⁶⁻²⁰.

At the proteomic level, the most relevant changes of C-IECM and/or Hcy-IECM were related to mitochondrial pathways and enzymes involved in other inherited disorders of metabolism, such as NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit A8 (NDUFA8), carnitine palmitoyltransferase 2 (CPT2) and ubiquinol-cytochrome c reductase, complex III subunit X (UQCR10). The pathogenic variants in these genes produce severe mitochondrial diseases. Of note, the genetic deficit in *NDUFA8* produces clinical outcomes that include cardiomyopathy, pulmonary hypertension, development delay, hypotonia, and cerebral atrophy. These clinical outcomes are also reported in the *cb1C* and *cb1G/E* types of IECM. The decreased expression of *NDUFA8* could participate in the occurrence of pulmonary hypertension of IECM, whose pathomechanisms are poorly known. *CPT2* plays a master role in the entry of fatty acyl CoA into mitochondria, and *CPT2* pathogenic mutations lead to cardiomyopathy, hypotonia, and seizures, which have also been reported in *cb1C* and *cb1G* IECM. *UQCR10* is a subunit of mitochondrial complex III, which forms the middle segment of the respiratory chain of the inner mitochondrial membrane²¹. There is currently no report of clinical outcomes due to pathogenic genetic mutations in this gene. However, given its crucial role in the mitochondrial respiratory chain, it may be expected that its decreased expression could also produce neurological manifestations and hypotonia.

Of note, among the 6 most significant PTM modifications of enzymes reported in *cbIC* patient fibroblasts, 5 (83%) were due to propionaldehyde addition. This PTM is consistent with the increased concentration of propionate and methylglyoxalate in *cbIC* patient fibroblasts, as these two molecules are metabolic precursors of propionaldehyde (Supplementary Fig. 1). The increased concentration of methylglyoxalate could be related to altered glycolysis, as evidenced by increased concentration of pyruvate (Fig.2 and Supplementary Fig. 1). Propionaldehyde additions were observed to a lesser extent in *cbIG* fibroblasts. Ornithine aminotransferase was the single enzyme with propionaldehyde addition in both *cbIC* and *cbIG* cells, but propionaldehyde addition was higher in *cbIC* fibroblasts than in *cbIG* fibroblasts. It is a mitochondrial matrix enzyme that catalyzes the reversible transamination of ornithine to glutamate semialdehyde. The disease can be revealed in the neonatal period by hyperammonemia, decreased plasma ornithine, and increased plasma glutamine, and these three metabolic outcomes are also observed in *cbIC* IECM (Fig. 1). The plasma ammonia levels normalize definitively later in life. The main clinical expression is retinopathy with a very particular aspect and, in some patients, moderate mental retardation. The spectrin encoded by *SPTAN1* is another protein with propionaldehyde addition in *cbIC* fibroblasts. Its genetic deficit can produce outcomes similar to those reported in *cbIC* IECM, including microcephaly, seizures, hypotonia, and cerebral atrophy. Spectrins are cytoskeletal proteins that organize intracellular organelles and are implicated in DNA repair and cell cycle regulation.

The activity of sirtuins is decreased in *cbIG* cells². The PTMs related to increased acylation of proteins in *cbIC* and *epicbIC* cells suggest that the combined deficit in *MS* and *MUT* could produce synergistic effects through decreased deacylation resulting from decreased sirtuins and increased acylation by increased organic acid production, as summarized in Fig. 6. This hypothesis is consistent with that of a very recent study that showed that PTMs with increased malonylation may impair the activity of key enzymes of the urea cycle and glycine cleavage pathway in the liver from cases with *MMA-IECM*²². These PTM and metabolic alterations were reversed by *Sirt5* engineered to resist acylation-driven inhibition via lysine-to-arginine mutagenesis using an adeno-associated viral 8 (*AAV8*) vector delivered to *MMA-IECM* mutant and control mice. The expression of the modified *Sirt5* by gene therapy ameliorated hyperammonemia and reduced global methylmalonylation in the *MMA-IECM* mouse model. In addition, the accumulation of organic acids triggers ultrastructural

mitochondrial alterations in the brain, liver, kidney, and heart through mechanisms that include PINK1/Parkin-mediated mitophagy in MMA-IECM²³⁻²⁷.

5. Conclusion

In conclusion, our results show that the metabolic, genomic, epigenomic, and translational consequences observed in patient fibroblasts may explain part of the metabolic and clinical manifestations of C-IECM. Many changes in transcriptional and protein expression and PTMs concern genes involved in rare diseases sharing common clinical manifestations with IECM, which could contribute to the great variability of IECM manifestations. Our results on PTMs suggest a synergy of mechanisms resulting from increased protein acylation by accumulating TCA-derived metabolites and the decreased deacylation of proteins by the decreased expression of sirtuins. The PTM mechanisms are expected to be cumulative and contribute to better understanding why some manifestations are specific to the early postnatal period and others to adulthood.

Acknowledgment and Funding

This project is supported by Inserm, University of Lorraine, CHRU Nancy, FHU ARRIMAGE, the GEENAGE program of the University of Lorraine funded by the French Agence Nationale de la Recherche, PIA project, Lorraine Université d'Excellence (LUE) ANR-15-IDEX-04-LUE, the OMAGE grant from the region GrandEST of France and FEDER funding from European Union (EU). Language editing was performed by Nature Research Editing Service.

Conflict of interest

The authors have no conflicts of interest to declare.

Author contributions

Wiedemann A and Guéant JL: Conceptualization, methodology, experimentation, statistical analysis, writing-reviewing and editing. Guéant-Rodriguez RM and Coelho D: Conceptualization, methodology, experimentation, statistical analysis, and writing. Jeannesson E, Mertens M, Rotaru I, Jean-Marc Alberto JM, Baspinar O, Hassan Z, Charif R, Chevreux G, Lignière L, Camadro JM: Experimentation, statistical analysis and reviewing.

References

1. Green R, Allen LH, Bjorke-Monsen AL, et al. Vitamin B(12) deficiency. *Nat Rev Dis Primers* 2017; **3**: 17040.
2. Gueant JL, Gueant-Rodriguez RM, Kosgei VJ, Coelho D. Causes and consequences of impaired methionine synthase activity in acquired and inherited disorders of vitamin B(12) metabolism. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2022; **57**(2): 133-55.
3. Froese DS, Fowler B, Baumgartner MR. Vitamin B(12) , folate, and the methionine remethylation cycle-biochemistry, pathways, and regulation. *J Inherit Metab Dis* 2019; **42**(4): 673-85.
4. Ghemrawi R, Arnold C, Battaglia-Hsu SF, et al. SIRT1 activation rescues the mislocalization of RNA-binding proteins and cognitive defects induced by inherited cobalamin disorders. *Metabolism* 2019; **101**: 153992.
5. Huemer M, Diodato D, Martinelli D, et al. Phenotype, treatment practice and outcome in the cobalamin-dependent remethylation disorders and MTHFR deficiency: Data from the E-HOD registry. *J Inherit Metab Dis* 2019; **42**(2): 333-52.
6. Horster F, Tuncel AT, Gleich F, et al. Delineating the clinical spectrum of isolated methylmalonic acidurias: cblA and mut. *J Inherit Metab Dis* 2021; **44**(1): 193-214.
7. Matmat K, Gueant-Rodriguez RM, Oussalah A, et al. Ocular manifestations in patients with inborn errors of intracellular cobalamin metabolism: a systematic review. *Hum Genet* 2022; **141**(7): 1239-51.
8. Battaglia-Hsu SF, Ghemrawi R, Coelho D, et al. Inherited disorders of cobalamin metabolism disrupt nucleocytoplasmic transport of mRNA through impaired methylation/phosphorylation of ELAVL1/HuR. *Nucleic Acids Res* 2018; **46**(15): 7844-57.
9. Rashka C, Hergalant S, Dreumont N, et al. Analysis of fibroblasts from patients with cblC and cblG genetic defects of cobalamin metabolism reveals global dysregulation of alternative splicing. *Hum Mol Genet* 2020; **29**(12): 1969-85.
10. Wiedemann A, Oussalah A, Lamireau N, et al. Clinical, phenotypic and genetic landscape of case reports with genetically proven inherited disorders of vitamin B(12) metabolism: A meta-analysis. *Cell Rep Med* 2022; **3**(7): 100670.
11. Kim D, Langmead B, Salzberg SL. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. *Nat Methods* 2015; **12**(4): 357-60.
12. Pertea M, Pertea GM, Antonescu CM, Chang TC, Mendell JT, Salzberg SL. StringTie enables improved reconstruction of a transcriptome from RNA-seq reads. *Nat Biotechnol* 2015; **33**(3): 290-5.
13. Robinson MD, Oshlack A. A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. *Genome Biol* 2010; **11**(3): R25.
14. Law CW, Chen Y, Shi W, Smyth GK. voom: Precision weights unlock linear model analysis tools for RNA-seq read counts. *Genome Biol* 2014; **15**(2): R29.
15. Ge SX, Jung D, Yao R. ShinyGO: a graphical gene-set enrichment tool for animals and plants. *Bioinformatics* 2020; **36**(8): 2628-9.
16. Ji Z, Liu GH, Qu J. Mitochondrial sirtuins, metabolism, and aging. *J Genet Genomics* 2022; **49**(4): 287-98.

17. Xiao ZP, Lv T, Hou PP, et al. Sirtuin 5-Mediated Lysine Desuccinylation Protects Mitochondrial Metabolism Following Subarachnoid Hemorrhage in Mice. *Stroke* 2021; **52**(12): 4043-53.
18. Forny P, Schumann A, Mustedanagic M, et al. Novel Mouse Models of Methylmalonic Aciduria Recapitulate Phenotypic Traits with a Genetic Dosage Effect. *J Biol Chem* 2016; **291**(39): 20563-73.
19. Lucienne M, Aguilar-Pimentel JA, Amarie OV, et al. In-depth phenotyping reveals common and novel disease symptoms in a hemizygous knock-in mouse model (Mut-ko/ki) of mut-type methylmalonic aciduria. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 2020; **1866**(3): 165622.
20. Lucienne M, Mathis D, Perkins N, Fingerhut R, Baumgartner MR, Froese DS. Decrease of disease-related metabolites upon fasting in a hemizygous knock-in mouse model (Mut-ko/ki) of methylmalonic aciduria. *JIMD Rep* 2021; **58**(1): 44-51.
21. Schagger H, Brandt U, Gencic S, von Jagow G. Ubiquinol-cytochrome-c reductase from human and bovine mitochondria. *Methods Enzymol* 1995; **260**: 82-96.
22. Head PE, Myung S, Chen Y, et al. Aberrant methylmalonylation underlies methylmalonic acidemia and is attenuated by an engineered sirtuin. *Sci Transl Med* 2022; **14**(646): eabn4772.
23. Luciani A, Schumann A, Berquez M, et al. Impaired mitophagy links mitochondrial disease to epithelial stress in methylmalonyl-CoA mutase deficiency. *Nat Commun* 2020; **11**(1): 970.
24. Luciani A, Denley MCS, Govers LP, Sorrentino V, Froese DS. Mitochondrial disease, mitophagy, and cellular distress in methylmalonic acidemia. *Cell Mol Life Sci* 2021; **78**(21-22): 6851-67.
25. Forny P, Bonilla X, Lamparter D, et al. 2022.
26. Longo N, Sass JO, Jurecka A, Vockley J. Biomarkers for drug development in propionic and methylmalonic acidemias. *J Inherit Metab Dis* 2022; **45**(2): 132-43.
27. Stanescu S, Belanger-Quintana A, Fernandez-Felix BM, et al. Interorgan amino acid interchange in propionic acidemia: the missing key to understanding its physiopathology. *Amino Acids* 2022; **54**(5): 777-86.
28. Haberle J, Burlina A, Chakrapani A, et al. Suggested guidelines for the diagnosis and management of urea cycle disorders: First revision. *J Inherit Metab Dis* 2019; **42**(6): 1192-230.
29. Lund AM, Skovby F, Vestergaard H, Christensen M, Christensen E. Clinical and biochemical monitoring of patients with fatty acid oxidation disorders. *J Inherit Metab Dis* 2010; **33**(5): 495-500.
30. Applegarth DA, Toone JR. Nonketotic hyperglycinemia (glycine encephalopathy): laboratory diagnosis. *Mol Genet Metab* 2001; **74**(1-2): 139-46.
31. Cleary MA, Dorland L, de Koning TJ, et al. Ornithine aminotransferase deficiency: diagnostic difficulties in neonatal presentation. *J Inherit Metab Dis* 2005; **28**(5): 673-9.
32. Coutelier M, Goizet C, Durr A, et al. Alteration of ornithine metabolism leads to dominant and recessive hereditary spastic paraplegia. *Brain* 2015; **138**(Pt 8): 2191-205.
33. Clarke C, Xiao R, Place E, et al. Mitochondrial respiratory chain disease discrimination by retrospective cohort analysis of blood metabolites. *Mol Genet Metab* 2013; **110**(1-2): 145-52.
34. Sim KG, Carpenter K, Hammond J, Christodoulou J, Wilcken B. Acylcarnitine profiles in fibroblasts from patients with respiratory chain defects can resemble those from patients with mitochondrial fatty acid beta-oxidation disorders. *Metabolism* 2002; **51**(3): 366-71.

35. Goedhart J, Luijsterburg MS. VolcaNoseR is a web app for creating, exploring, labeling and sharing volcano plots. *Sci Rep* 2020; **10**(1): 20560.

Figure legends

Fig. 1. Metabolic biochemical markers in patients with inborn errors of cobalamin (cbl) metabolism (IECM), including in 2 patients with CblC disease, 1 patient with epi-CblC and 3 patients with MMUT disease at diagnosis and compared to those in patients with typical biological abnormalities in urea cycle disorders, fatty acid beta-oxidation deficiency and gene deficiency related to B12 metabolism.

Footnote: Heatmap color code: yellow, unchanged; red, increased; green, decreased; and gray, non documented. MMUT: methylmalonyl-CoA mutase, CblC: cobalamin C, Epi-CblC: PRDX1 gene-related epi-cblC disease, MMA: Methylmalonic acidemia, CPSI: Carbamoyl phosphate synthetase 1, NAGS: N-acetylglutamate synthetase, OTC: Ornithine transcarbamylase, ASS: arginosuccinate synthetase, ASL: arginosuccinate lyase, ARG: arginase, SCADD: Short-chain acyl-CoA dehydrogenase (SCAD) deficiency, MCADD: Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) deficiency, LCADD: Very long chain acyl CoA dehydrogenase deficiency, CPT2D: Carnitine palmitoyltransferase II deficiency, GLDCD: glycine decarboxylase deficiency, OATD: Ornithine- δ -aminotransferase deficiency, P5CSD: Delta-1-pyrroline-5-carboxylate-synthetase deficiency (ALDH18A1 mutation), MT: Mitochondrial respiratory chain disease, C0: Free carnitine, C2: acetylcarnitine, C3: propionylcarnitine.

* IECM biochemical markers are extracted from Wiedemann et al. 2022 Meta-analysis with percentage of occurrence reported in literature; results reported above or under normal values are reported according to the color legend with the proportion of abnormal values¹⁰.

† Plasma amino acids disorders are reported as described in the guidelines of diagnosis of urea cycle disorders, Häberle et al. 2019²⁸

§ No plasma amino acids disorders are reported in classic FAO deficiency, and they are not useful for diagnosis²⁹.

‡ Plasma amino acids are not modified in cases of classic nonketotic hyperglycinemia according to Applegarth et al. 2001³⁰.

|| Plasma amino acids are modified in cases of OAT deficiency with neonatal hyperammonemia onset according to Cleary et al. 2005³¹ and Häberle et al. 2019²⁸.

¶ Plasma amino acids are modified in cases of ALDH18A1 according to Coutelier et al. 2015³².

** Blood metabolites observed in cases of mitochondrial respiratory chain diseases are reported according to Clarke et al. 2013 ³³. Acylcarnitine might also be increased without specificity according to Sim et al. 2002 ³⁴.

Fig. 2. Metabolic analysis of the TCA cycle in cbIC and cbIG fibroblasts. (A). Schematic representation of the TCA cycle. (B). Metabolomic analysis of TCA cycle metabolites in cbIC and cbIG fibroblasts using LC-MS/MS. Student's t test * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. N=4 to 5 per group.

Fig. 3. Vulcano plot representations of transcriptomic and proteomic analyses in fibroblasts from cbIC and cbIG types of inborn errors of cobalamin metabolism compared to control cells. The VolcanoR application was used to create the plots (realized with VolcanoR ³⁵).

Fig. 4. Bioinformatics analysis of both transcriptomic and proteomic modified genes in cbIC or cbIG patient fibroblasts. (A). Enriched GO biological process terms in cbIC fibroblasts. (B). Enriched GO biological process terms in cbIG fibroblasts. (C). The most significantly enriched terms and KEGG pathways in cbIG fibroblasts. N=3 per group.

Fig. 5. Post translational modifications (PRM) in proteins of fibroblasts from cbIC and cbIG patient's fibroblasts. (A). Heatmap and sequences of peptides with significant PTMs in CbIC vs. Control ($pvalue < 0.05$). (B). Heatmap and sequences of peptides with significant PTMs in CbIG vs. Control ($pvalue < 0.05$). (C). Magnitude of Propionaldehyde modified ornithine aminotransferase reported in cbIC and cbIG patient's fibroblasts (D). Principal component analysis of modified peptides with an ANOVA multigroup filtering at $p < 0.05$ in cbIC and cbIG patient and control fibroblasts.

Fig. 6. Summary of the genomic, proteomic and posttranslational consequences of the *cbIC* type of inherited disorders of cbl metabolism. The combined deficit of MUT and MS activities produces synergistic effects with consequences related to altered expression and function of proteins that may contribute to the clinical and metabolic phenotypes. The deficit in MUT increases the concentration of MMA and the subsequent methylmalonylation of proteins. The deficit in MS increases the concentration of Hcy, decreases SAM and produces endoplasmic

reticulum (ER) stress and epigenomic, proteomic and metabolomic alterations through deactivation of the PGC1 α /nuclear receptor complexes, disruption of the HuR-dependent nucleo-cytoplasmic shuttling of mRNA and subsequent decreased activity of sirtuins. The impaired sirtuin activities increase posttranslational modifications (PTMs) of proteins by decreasing the removal of acetyl, propionyl, succinyl, glutaryl, malonyl and methylmalonyl acylations of lysine residues of target enzymes [15, 16]. In synergy with the decreased protein sirtuin-dependent deacylation related to MS, the deficit in MUT increases the production of propionic acid and methylmalonic acid and other organic acids that may trigger the acylation of lysine residues of proteins involved in respiratory chain complexes, beta-oxidation, the urea cycle, the TCA cycle and the decarboxylation of glycine in liver and heart.

Références

1. Biermer A. Anton Biermer, M.D. *Br Med J.* 1892;2:696–7.
2. Mudd SH, Levy HL, Abeles RH, Jenedy JP, Jr. A derangement in B 12 metabolism leading to homocystinemia, cystathioninemia and methylmalonic aciduria. *Biochem Biophys Res Commun.* 1969;35(1):121-6.
3. Nguengang Wakap S, Lambert DM, Olry A, Rodwell C, Gueydan C, Lanneau V, et al. Estimating cumulative point prevalence of rare diseases: analysis of the Orphanet database. *Eur J Hum Genet.* 2020;28(2):165-73.
4. Mergnac JP, Wiedemann A, Chery C, Ravel JM, Namour F, Gueant JL, et al. Diagnostic yield of clinical exome sequencing as a first-tier genetic test for the diagnosis of genetic disorders in pediatric patients: results from a referral center study. *Hum Genet.* 2022;141(7):1269-78.
5. Ducker GS, Rabinowitz JD. One-Carbon Metabolism in Health and Disease. *Cell Metabolism.* 2017;25(1):27-42.
6. Martínez-Reyes I, Chandel NS. Mitochondrial TCA cycle metabolites control physiology and disease. *Nature Communications.* 2020;11(1):102.
7. Zheng Y, Cantley LC. Toward a better understanding of folate metabolism in health and disease. *The Journal of Experimental Medicine.* 2019;216(2):253-66.
8. Scott JM. Folate and vitamin B12. *Proceedings of the Nutrition Society.* 1999;58(2):441-8.
9. Wills L. TREATMENT OF "PERNICIOUS ANAEMIA OF PREGNANCY" AND "TROPICAL ANAEMIA". *British Medical Journal.* 1931;1(3676):1059-64.
10. Wills L. A Note on the Use of Marmite in Tropical Macrocytic Anæmia, Including Pernicious Anæmia of Pregnancy. *The Indian Medical Gazette.* 1933;68(3):133-4.
11. Day PL, Langston WC, Darby WJ. Failure of Nicotinic Acid to Prevent Nutritional Cytopenia in the Monkey. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine.* 1938;38(5):860-3.
12. Davidson LS, Davis LJ, Innes J. Megaloblastic Anaemia of Pregnancy and the Puerperium. *British Medical Journal.* 1942;2(4253):31-4.
13. Hoffbrand AV, Weir DG. The history of folic acid. *British Journal of Haematology.* 2001;113(3):579-89.
14. Mitchell HK, Snell EE, Williams RJ. THE CONCENTRATION OF "FOLIC ACID". *Journal of the American Chemical Society.* 1941;63(8):2284-.
15. Farber S, Diamond LK. Temporary remissions in acute leukemia in children produced by folic acid antagonist, 4-aminopteroyl-glutamic acid. *The New England Journal of Medicine.* 1948;238(23):787-93.
16. Blakley RL. The biochemistry of folic acid and related pteridines. Amsterdam; London: North-Holland Publishing Co.; 1969 1969.
17. Pitkin RM. Folate and neural tube defects. *The American Journal of Clinical Nutrition.* 2007;85(1):285S-8S.
18. (CDC) CfDC. Use of folic acid for prevention of spina bifida and other neural tube defects--1983-1991. *MMWR Morbidity and mortality weekly report.* 1991;40(30):513-6.
19. Folic Acid - Drug Usage Statistics, ClinCalc DrugStats Database [
20. ANSES. Les références nutritionnelles en vitamines et minéraux. 2021.
21. Carreras CW, Santi DV. The catalytic mechanism and structure of thymidylate synthase. *Annual Review of Biochemistry.* 1995;64:721-62.
22. Ducker GS, Chen L, Morscher RJ, Ghergurovich JM, Esposito M, Teng X, et al. Reversal of Cytosolic One-Carbon Flux Compensates for Loss of the Mitochondrial Folate Pathway. *Cell Metabolism.* 2016;23(6):1140-53.

23. French JB, Jones SA, Deng H, Pedley AM, Kim D, Chan CY, et al. Spatial colocalization and functional link of purinosomes with mitochondria. *Science (New York, NY)*. 2016;351(6274):733-7.
24. Tucker EJ, Hershman SG, Köhrer C, Belcher-Timme CA, Patel J, Goldberger OA, et al. Mutations in MTFMT underlie a human disorder of formylation causing impaired mitochondrial translation. *Cell Metabolism*. 2011;14(3):428-34.
25. Banerjee R. B12 trafficking in mammals: A for coenzyme escort service. *ACS chemical biology*. 2006;1(3):149-59.
26. Minot GR, Murphy WP. TREATMENT OF PERNICIOUS ANEMIA BY A SPECIAL DIET. *Journal of the American Medical Association*. 1926;87(7):470-6.
27. Cannon JR, Johnson AW, Todd AR. Structure of vitamin B12; a crystalline nucleotide-free degradation product of vitamin B12. *Nature*. 1954;174(4443):1168-9.
28. Hodgkin DC, Kamper J, Mackay M, Pickworth J, Trueblood KN, White JG. Structure of vitamin B12. *Nature*. 1956;178(4524):64-6.
29. Woodward RB. The total synthesis of vitamin B 12. *Pure and Applied Chemistry Chimie Pure Et Appliquee*. 1973;33(1):145-77.
30. Taga ME, Larsen NA, Howard-Jones AR, Walsh CT, Walker GC. BluB cannibalizes flavin to form the lower ligand of vitamin B12. *Nature*. 2007;446(7134):449-53.
31. Hunt A, Harrington D, Robinson S. Vitamin B12 deficiency. *BMJ (Clinical research ed)*. 2014;349:g5226.
32. Pawlak R, Parrott SJ, Raj S, Cullum-Dugan D, Lucus D. How prevalent is vitamin B(12) deficiency among vegetarians? *Nutrition Reviews*. 2013;71(2):110-7.
33. Finkelstein JL, Fothergill A, Johnson CB, Guetterman HM, Bose B, Jabbar S, et al. Anemia and Vitamin B-12 and Folate Status in Women of Reproductive Age in Southern India: Estimating Population-Based Risk of Neural Tube Defects. *Current Developments in Nutrition*. 2021;5(5):nzab069.
34. Allen LH, Miller JW, de Groot L, Rosenberg IH, Smith AD, Refsum H, et al. Biomarkers of Nutrition for Development (BOND): Vitamin B-12 Review. *J Nutr*. 2018;148(suppl_4):1995S-2027S.
35. Gueant JL, Gueant-Rodriguez RM, Kosgei VJ, Coelho D. Causes and consequences of impaired methionine synthase activity in acquired and inherited disorders of vitamin B(12) metabolism. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2022;57(2):133-55.
36. Luciani A, Devuyst O. Methylmalonyl acidemia: from mitochondrial metabolism to defective mitophagy and disease. *Autophagy*. 2020;16(6):1159-61.
37. Forny P, Hörster F, Ballhausen D, Chakrapani A, Chapman KA, Dionisi-Vici C, et al. Guidelines for the diagnosis and management of methylmalonic acidemia and propionic acidemia: First revision. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 2021;44(3):566-92.
38. Yao R, Rhee MS, Galivan J. Effects of gamma-glutamyl hydrolase on folyl and antifolylpolyglutamates in cultured H35 hepatoma cells. *Molecular Pharmacology*. 1995;48(3):505-11.
39. Visentin M, Diop-Bove N, Zhao R, Goldman ID. The Intestinal Absorption of Folates. *Annual review of physiology*. 2014;76:251-74.
40. Guéant J-L, Namour F, Guéant-Rodriguez R-M, Daval J-L. Folate and fetal programming: a play in epigenomics? *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 2013;24(6):279-89.
41. Said HM. Intestinal absorption of water-soluble vitamins in health and disease. *The Biochemical Journal*. 2011;437(3):357-72.
42. Ohrvik VE, Witthoft CM. Human folate bioavailability. *Nutrients*. 2011;3(4):475-90.
43. Guéant J-L, Guéant-Rodriguez R-M, Alpers DH. Vitamin B12 absorption and malabsorption. *Vitamins and Hormones*. 2022;119:241-74.

44. Froese DS, Fowler B, Baumgartner MR. Vitamin B12 , folate, and the methionine remethylation cycle-biochemistry, pathways, and regulation. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 2019;42(4):673-85.
45. Allen RH, Seetharam B, Allen NC, Podell ER, Alpers DH. Correction of cobalamin malabsorption in pancreatic insufficiency with a cobalamin analogue that binds with high affinity to R protein but not to intrinsic factor. In vivo evidence that a failure to partially degrade R protein is responsible for cobalamin malabsorption in pancreatic insufficiency. *The Journal of Clinical Investigation*. 1978;61(6):1628-34.
46. Russell-Jones GJ, Alpers DH. Vitamin B12 transporters. *Pharmaceutical Biotechnology*. 1999;12:493-520.
47. Nicolas JP, Guéant JL. [Absorption, distribution and excretion of vitamin B12]. *Annales De Gastroenterologie Et D'hepatologie*. 1994;30(6):270-6, 81; discussion 81-82.
48. Schwartz M. Intrinsic factor antibody in serum from patients with pernicious anaemia. *Lancet (London, England)*. 1960;2(7163):1263-7.
49. He Q, Madsen M, Kilkenney A, Gregory B, Christensen EI, Vorum H, et al. Amnionless function is required for cubilin brush-border expression and intrinsic factor-cobalamin (vitamin B12) absorption in vivo. *Blood*. 2005;106(4):1447-53.
50. 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.
51. Guéant JL, Chéry C, Namour F. Cubilin and the hydrophobic intrinsic factor receptor are distinct molecules. *Blood*. 2001;97(10):3316-7.
52. 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.
53. Nielsen MJ, Rasmussen MR, Andersen CBF, Nexø E, Moestrup SK. Vitamin B12 transport from food to the body's cells--a sophisticated, multistep pathway. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 2012;9(6):345-54.
54. Fedosov SN. Physiological and molecular aspects of cobalamin transport. *Sub-Cellular Biochemistry*. 2012;56:347-67.
55. Birn H, Willnow TE, Nielsen R, Norden AGW, Bönsch C, Moestrup SK, et al. Megalin is essential for renal proximal tubule reabsorption and accumulation of transcobalamin-B(12). *American Journal of Physiology Renal Physiology*. 2002;282(3):F408-16.
56. Park HJ, Kim J-Y, Jung KI, Kim TJ. Characterization of a Novel Gene in the Extended MHC Region of Mouse, NG29/Cd320, a Homolog of the Human CD320. *Immune Network*. 2009;9(4):138-46.
57. 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.
58. Rutsch F, Gailus S, Miousse IR, Suormala T, Sagné C, Toliat MR, et al. Identification of a putative lysosomal cobalamin exporter altered in the cblF defect of vitamin B12 metabolism. *Nature Genetics*. 2009;41(2):234-9.
59. Coelho D, Kim JC, Miousse IR, Fung S, du Moulin M, Buers I, et al. Mutations in ABCD4 cause a new inborn error of vitamin B12 metabolism. *Nature Genetics*. 2012;44(10):1152-5.
60. Froese DS, Krojer T, Wu X, Shrestha R, Kiyani W, von Delft F, et al. Structure of MMACHC reveals an arginine-rich pocket and a domain-swapped dimer for its B12 processing function. *Biochemistry*. 2012;51(25):5083-90.
61. Hannibal L, Kim J, Brasch NE, Wang S, Rosenblatt DS, Banerjee R, et al. Processing of alkylcobalamins in mammalian cells: A role for the MMACHC (cblC) gene product. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2009;97(4):260-6.

62. 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(38):14551-4.
63. Froese DS, Kopec J, Fitzpatrick F, Schuller M, McCorvie TJ, Chalk R, et al. Structural Insights into the MMACHC-MMADHC Protein Complex Involved in Vitamin B12 Trafficking. *The Journal of Biological Chemistry*. 2015;290(49):29167-77.
64. Mah W, Deme JC, Watkins D, Fung S, Janer A, Shoubridge EA, et al. Subcellular location of MMACHC and MMADHC, two human proteins central to intracellular vitamin B(12) metabolism. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2013;108(2):112-8.
65. Stucki M, Coelho D, Suormala T, Burda P, Fowler B, Baumgartner MR. Molecular mechanisms leading to three different phenotypes in the cblD defect of intracellular cobalamin metabolism. *Human Molecular Genetics*. 2012;21(6):1410-8.
66. 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(14):1454-64.
67. McDonald MK, Fritz J-A, Jia D, Scheuchner D, Snyder FF, Stanislaus A, et al. Identification of ABC transporters acting in vitamin B12 metabolism in *Caenorhabditis elegans*. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2017;122(4):160-71.
68. Schubert HL, Hill CP. Structure of ATP-bound human ATP:cobalamin adenosyltransferase. *Biochemistry*. 2006;45(51):15188-96.
69. Padovani D, Labunska T, Palfey BA, Ballou DP, Banerjee R. Adenosyltransferase tailors and delivers coenzyme B12. *Nature Chemical Biology*. 2008;4(3):194-6.
70. Plessl T, Bürer C, Lutz S, Yue WW, Baumgartner MR, Froese DS. Protein destabilization and loss of protein-protein interaction are fundamental mechanisms in cblA-type methylmalonic aciduria. *Human Mutation*. 2017;38(8):988-1001.
71. Bassila C, Ghemrawi R, Flayac J, Froese DS, Baumgartner MR, Guéant J-L, et al. Methionine synthase and methionine synthase reductase interact with MMACHC and with MMADHC. *Biochimica Et Biophysica Acta Molecular Basis of Disease*. 2017;1863(1):103-12.
72. Olteanu H, Banerjee R. Human methionine synthase reductase, a soluble P-450 reductase-like dual flavoprotein, is sufficient for NADPH-dependent methionine synthase activation. *The Journal of Biological Chemistry*. 2001;276(38):35558-63.
73. Ermens AaM, Vlasveld LT, Lindemans J. Significance of elevated cobalamin (vitamin B12) levels in blood. *Clinical Biochemistry*. 2003;36(8):585-90.
74. Nielsen R, Christensen EI, Birn H. Megalin and cubilin in proximal tubule protein reabsorption: from experimental models to human disease. *Kidney International*. 2016;89(1):58-67.
75. Guéant JL, Monin B, Boissel P, Gaucher P, Nicolas JP. Biliary excretion of cobalamin and cobalamin analogues in man. *Digestion*. 1984;30(3):151-7.
76. Cheng C-H, Tsai T-P, Chen W-S, Huang Y-C. Serum folate is a reliable indicator of hyperhomocysteinemia and borderline hyperhomocysteinemia in young adults. *Nutrition Research (New York, NY)*. 2009;29(10):743-9.
77. Katz JE, Dlakić M, Clarke S. Automated identification of putative methyltransferases from genomic open reading frames. *Molecular & cellular proteomics: MCP*. 2003;2(8):525-40.
78. Mentch SJ, Locasale JW. One-carbon metabolism and epigenetics: understanding the specificity. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2016;1363:91-8.
79. Du J, Johnson LM, Jacobsen SE, Patel DJ. DNA methylation pathways and their crosstalk with histone methylation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2015;16(9):519-32.

80. Moore LD, Le T, Fan G. DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*. 2013;38(1):23-38.
81. Baric I, Fumic K, Glenn B, Cuk M, Schulze A, Finkelstein JD, et al. S-adenosylhomocysteine hydrolase deficiency in a human: a genetic disorder of methionine metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(12):4234-9.
82. Janosík M, Kery V, Gaustadnes M, Maclean KN, Kraus JP. Regulation of human cystathionine beta-synthase by S-adenosyl-L-methionine: evidence for two catalytically active conformations involving an autoinhibitory domain in the C-terminal region. *Biochemistry*. 2001;40(35):10625-33.
83. Zaric BL, Obradovic M, Bajic V, Haidara MA, Jovanovic M, Isenovic ER. Homocysteine and Hyperhomocysteinaemia. *Current Medicinal Chemistry*. 2019;26(16):2948-61.
84. Homma T, Fujii J. Application of Glutathione as Anti-Oxidative and Anti-Aging Drugs. *Current Drug Metabolism*. 2015;16(7):560-71.
85. Aoyama K. Glutathione in the Brain. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(9):5010.
86. Pan Y, Liu Y, Guo H, Jabir MS, Liu X, Cui W, et al. Associations between Folate and Vitamin B12 Levels and Inflammatory Bowel Disease: A Meta-Analysis. *Nutrients*. 2017;9(4):E382.
87. Gomollón F, Gargallo CJ, Muñoz JF, Vicente R, Lue A, Mir A, et al. Oral Cyanocobalamin is Effective in the Treatment of Vitamin B12 Deficiency in Crohn's Disease. *Nutrients*. 2017;9(3):E308.
88. Bizzaro N, Antico A. Diagnosis and classification of pernicious anemia. *Autoimmunity Reviews*. 2014;13(4-5):565-8.
89. Allen RH, Stabler SP, Savage DG, Lindenbaum J. Diagnosis of cobalamin deficiency I: usefulness of serum methylmalonic acid and total homocysteine concentrations. *American Journal of Hematology*. 1990;34(2):90-8.
90. Froese DS, Kopec J, Rembeza E, Bezerra GA, Oberholzer AE, Suormala T, et al. Structural basis for the regulation of human 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase by phosphorylation and S-adenosylmethionine inhibition. *Nature Communications*. 2018;9(1):2261.
91. Battaglia-Hsu S-f, Akchiche N, Noel N, Alberto J-M, Jeannesson E, Orozco-Barrios CE, et al. Vitamin B12 deficiency reduces proliferation and promotes differentiation of neuroblastoma cells and up-regulates PP2A, proNGF, and TACE. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(51):21930-5.
92. Orozco-Barrios CE, Battaglia-Hsu S-F, Arango-Rodriguez ML, Ayala-Davila J, Chery C, Alberto J-M, et al. Vitamin B12-impaired metabolism produces apoptosis and Parkinson phenotype in rats expressing the transcobalamin-oleosin chimera in substantia nigra. *PloS One*. 2009;4(12):e8268.
93. Lai S-C, Nakayama Y, Sequeira JM, Quadros EV. Down-regulation of transcobalamin receptor TCblR/CD320 by siRNA inhibits cobalamin uptake and proliferation of cells in culture. *Experimental Cell Research*. 2011;317(11):1603-7.
94. McLean GR, Pathare PM, Wilbur DS, Morgan AC, Woodhouse CS, Schrader JW, et al. Cobalamin analogues modulate the growth of leukemia cells in vitro. *Cancer Research*. 1997;57(18):4015-22.
95. Rizzo G, Laganà AS, Rapisarda AMC, La Ferrera GMG, Buscema M, Rossetti P, et al. Vitamin B12 among Vegetarians: Status, Assessment and Supplementation. *Nutrients*. 2016;8(12):E767.

96. 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.
97. Duan W, 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. *Journal of Neurochemistry*. 2002;80(1):101-10.
98. Ferreira CR, Rahman S, Keller M, Zschocke J, Group IA. An international classification of inherited metabolic disorders (ICIMD). *J Inherit Metab Dis*. 2021;44(1):164-77.
99. Villani GR, Gallo G, Scolamiero E, Salvatore F, Ruoppolo M. "Classical organic acidurias": diagnosis and pathogenesis. *Clin Exp Med*. 2017;17(3):305-23.
100. Watkins D, Rosenblatt DS. Failure of lysosomal release of vitamin B12: a new complementation group causing methylmalonic aciduria (cblF). *American Journal of Human Genetics*. 1986;39(3):404-8.
101. Watkins D, Rosenblatt DS. Inherited defects of cobalamin metabolism. *Vitamins and Hormones*. 2022;119:355-76.
102. Gordon MM, Brada N, Remacha A, Badell I, del Río E, Baiget M, et al. A genetic polymorphism in the coding region of the gastric intrinsic factor gene (GIF) is associated with congenital intrinsic factor deficiency. *Human Mutation*. 2004;23(1):85-91.
103. 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.
104. 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(11):4130-3.
105. Herbert V, Streiff RR, Sullivan LW. NOTES ON VITAMIN B12 ABSORPTION; AUTOIMMUNITY AND CHILDHOOD PERNICIOUS ANEMIA; RELATION OF INTRINSIC FACTOR TO BLOOD GROUP SUBSTANCE. *Medicine*. 1964;43:679-87.
106. McIntyre OR, Sullivan LW, Jeffries GH, Silver RH. PERNICIOUS ANEMIA IN CHILDHOOD. *The New England Journal of Medicine*. 1965;272:981-6.
107. Miller DR, Bloom GE, Streiff RR, LoBuglio AF, Diamond LK. Juvenile "congenital" pernicious anemia. Clinical and immunologic studies. *The New England Journal of Medicine*. 1966;275(18):978-83.
108. Carmel R. Gastric juice in congenital pernicious anemia contains no immunoreactive intrinsic factor molecule: study of three kindreds with variable ages at presentation, including a patient first diagnosed in adulthood. *American Journal of Human Genetics*. 1983;35(1):67-77.
109. Tanner SM, Li Z, Bisson R, Acar C, Oner C, Oner R, et al. Genetically heterogeneous selective intestinal malabsorption of vitamin B12: founder effects, consanguinity, and high clinical awareness explain aggregations in Scandinavia and the Middle East. *Human Mutation*. 2004;23(4):327-33.
110. Gräsbeck R. Imerslund-Gräsbeck syndrome (selective vitamin B12 malabsorption with proteinuria). *Orphanet Journal of Rare Diseases*. 2006;1(1):17.
111. Kalayci O, Cetin M, Kirel B, Ozdirim E, Yetgin S, Aysun S, et al. Neurologic findings of vitamin B12 deficiency: presentation of 7 cases. *The Turkish Journal of Pediatrics*. 1996;38(1):67-72.
112. Imerslund O. Idiopathic chronic megaloblastic anemia in children. *Acta Paediatrica Supplementum*. 1960;49(Suppl 119):1-115.
113. Guéant JL, Saunier M, Gastin I, Safi A, Lamireau T, Duclos B, et al. Decreased activity of intestinal and urinary intrinsic factor receptor in Gräsbeck-Imerslund disease [corrected]. *Gastroenterology*. 1995;108(6):1622-8.

114. Carmel R, Parker J, Kelman Z. Genomic mutations associated with mild and severe deficiencies of transcobalamin I (haptocorrin) that cause mildly and severely low serum cobalamin levels. *British Journal of Haematology*. 2009;147(3):386-91.
115. Carmel R, Herbert V. Deficiency of vitamin B12-binding alpha globulin in two brothers. *Blood*. 1969;33(1):1-12.
116. Lin JC, Borregaard N, Liebman HA, Carmel R. Deficiency of the specific granule proteins, R-binder/transcobalamin I and lactoferrin, in plasma and saliva: a new disorder. *American Journal of Medical Genetics*. 2001;100(2):145-51.
117. Regec A, Quadros EV, Platica O, Rothenberg SP. The cloning and characterization of the human transcobalamin II gene. *Blood*. 1995;85(10):2711-9.
118. Trakadis YJ, Alfares A, Bodamer OA, Buyukavci M, Christodoulou J, Connor P, et al. Update on transcobalamin deficiency: clinical presentation, treatment and outcome. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 2014;37(3):461-73.
119. Namour F, Helfer A-C, Quadros EV, Alberto J-M, Bibi HM, Orning L, et al. Transcobalamin deficiency due to activation of an intra exonic cryptic splice site. *British Journal of Haematology*. 2003;123(5):915-20.
120. Watkins D, Rosenblatt DS. Immunodeficiency and inborn disorders of vitamin B12 and folate metabolism. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*. 2020;23(4):241-6.
121. Quadros EV, Lai S-C, Nakayama Y, Sequeira JM, Hannibal L, Wang S, et al. Positive newborn screen for methylmalonic aciduria identifies the first mutation in TCblR/CD320, the gene for cellular uptake of transcobalamin-bound vitamin B(12). *Human Mutation*. 2010;31(8):924-9.
122. Karth P, Singh R, Kim J, Costakos D. Bilateral central retinal artery occlusions in an infant with hyperhomocysteinemia. *Journal of AAPOS: the official publication of the American Association for Pediatric Ophthalmology and Strabismus*. 2012;16(4):398-400.
123. Deciphering Developmental Disorders Study G, Constantinou P, D'Alessandro M, Lochhead P, Samant S, Bisset WM, et al. A New, Atypical Case of Cobalamin F Disorder Diagnosed by Whole Exome Sequencing. *Mol Syndromol*. 2016;6(5):254-8.
124. Armour CM, Brebner A, Watkins D, Geraghty MT, Chan A, Rosenblatt DS. A patient with an inborn error of vitamin B12 metabolism (cblF) detected by newborn screening. *Pediatrics*. 2013;132(1):e257-61.
125. Gailus S, Suormala T, Malerczyk-Aktas AG, Toliat MR, Wittkamp T, Stucki M, et al. A novel mutation in LMBRD1 causes the cblF defect of vitamin B(12) metabolism in a Turkish patient. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 2010;33(1):17-24.
126. Huemer M, Diodato D, Schwahn B, Schiff M, Bandeira A, Benoist J-F, et al. Guidelines for diagnosis and management of the cobalamin-related remethylation disorders cblC, cblD, cblE, cblF, cblG, cblJ and MTHFR deficiency. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 2017;40(1):21-48.
127. Hwang N, Jang J-H, Cho E-H, Choi R, Choi S-J, Park H-D. Prenatal diagnosis of combined methylmalonic acidemia and homocystinuria cobalamin C type using clinical exome sequencing and targeted gene analysis. *Molecular Genetics & Genomic Medicine*. 2021;9(11):e1838.
128. Liu Y, Kang L, Li D, Jin Y, Song J, Li H, et al. Patients with cobalamin G or J defect missed by the current newborn screening program: diagnosis and novel mutations. *Journal of Human Genetics*. 2019;64(4):305-12.
129. Takeichi T, Hsu C-K, Yang H-S, Chen H-Y, Wong T-W, Tsai W-L, et al. Progressive hyperpigmentation in a Taiwanese child due to an inborn error of vitamin B12 metabolism (cblJ). *The British Journal of Dermatology*. 2015;172(4):1111-5.

130. Kim JC, Lee N-C, Hwu PW-L, Chien Y-H, Fahiminiya S, Majewski J, et al. Late onset of symptoms in an atypical patient with the cblJ inborn error of vitamin B12 metabolism: diagnosis and novel mutation revealed by exome sequencing. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2012;107(4):664-8.
131. Lerner-Ellis JP, Tirone JC, Pawelek PD, Doré C, Atkinson JL, Watkins D, et al. Identification of the gene responsible for methylmalonic aciduria and homocystinuria, cblC type. *Nature Genetics*. 2006;38(1):93-100.
132. Morel CF, Lerner-Ellis JP, Rosenblatt DS. Combined methylmalonic aciduria and homocystinuria (cblC): phenotype-genotype correlations and ethnic-specific observations. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2006;88(4):315-21.
133. Huemer M, Diodato D, Martinelli D, Olivieri G, Blom H, Gleich F, et al. Phenotype, treatment practice and outcome in the cobalamin-dependent remethylation disorders and MTHFR deficiency: Data from the E-HOD registry. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 2019;42(2):333-52.
134. Fischer S, Huemer M, Baumgartner M, Deodato F, Ballhausen D, Boneh A, et al. Clinical presentation and outcome in a series of 88 patients with the cblC defect. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 2014;37(5):831-40.
135. Carrillo-Carrasco N, Chandler RJ, Venditti CP. Combined methylmalonic acidemia and homocystinuria, cblC type. I. Clinical presentations, diagnosis and management. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 2012;35(1):91-102.
136. Carrillo-Carrasco N, Venditti CP. Combined methylmalonic acidemia and homocystinuria, cblC type. II. Complications, pathophysiology, and outcomes. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 2012;35(1):103-14.
137. Brooks BP, Thompson AH, Sloan JL, Manoli I, Carrillo-Carrasco N, Zein WM, et al. Ophthalmic Manifestations and Long-Term Visual Outcomes in Patients with Cobalamin C Deficiency. *Ophthalmology*. 2016;123(3):571-82.
138. Beck BB, van Spronsen F, Diepstra A, Berger RMF, Kömhoff M. Renal thrombotic microangiopathy in patients with cblC defect: review of an under-recognized entity. *Pediatric Nephrology (Berlin, Germany)*. 2017;32(5):733-41.
139. Profitlich LE, Kirmse B, Wasserstein MP, Diaz GA, Srivastava S. High prevalence of structural heart disease in children with cblC-type methylmalonic aciduria and homocystinuria. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2009;98(4):344-8.
140. Thakkar K, Billa G. Treatment of vitamin B12 deficiency-methylcobalamine? Cyanocobalamine? Hydroxocobalamine?-clearing the confusion. *European Journal of Clinical Nutrition*. 2015;69(1):1-2.
141. Smith SE, Kinney HC, Swoboda KJ, Levy HL. Subacute combined degeneration of the spinal cord in cblC disorder despite treatment with B12. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2006;88(2):138-45.
142. Scalais E, Osterheld E, Geron C, Pierron C, Chafai R, Schlessner V, et al. Parenteral hydroxocobalamin dose intensification in five patients with different types of early onset intracellular cobalamin defects: Clinical and biochemical responses. *JIMD reports*. 2019;49(1):70-9.
143. Carrillo-Carrasco N, Sloan J, Valle D, Hamosh A, Venditti CP. Hydroxocobalamin dose escalation improves metabolic control in cblC. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 2009;32(6):728-31.
144. Trefz FK, Scheible D, Frauendienst-Egger G, Huemer M, Suomala T, Fowler B, et al. Successful intrauterine treatment of a patient with cobalamin C defect. *Molecular Genetics and Metabolism Reports*. 2016;6:55-9.
145. Gueant JL, Chery C, Oussalah A, Nadaf J, Coelho D, Josse T, et al. APRDX1 mutant allele causes a MMACHC secondary epimutation in cblC patients. *Nat Commun*. 2018;9(1):67.

146. Cavicchi C, Oussalah A, Falliano S, Ferri L, Gozzini A, Gasperini S, et al. PRDX1 gene-related epi-cblC disease is a common type of inborn error of cobalamin metabolism with mono- or bi-allelic MMACHC epimutations. *Clin Epigenetics*. 2021;13(1):137.
147. Yu H-C, Sloan JL, Scharer G, Brebner A, Quintana AM, Achilly NP, et al. An X-linked cobalamin disorder caused by mutations in transcriptional coregulator HCFC1. *American Journal of Human Genetics*. 2013;93(3):506-14.
148. Gérard M, Morin G, Bourillon A, Colson C, Mathieu S, Rabier D, et al. Multiple congenital anomalies in two boys with mutation in HCFC1 and cobalamin disorder. *European Journal of Medical Genetics*. 2015;58(3):148-53.
149. Scalais E, Osterheld E, Weitzel C, De Meirleir L, Mataigne F, Martens G, et al. X-Linked Cobalamin Disorder (HCFC1) Mimicking Nonketotic Hyperglycinemia With Increased Both Cerebrospinal Fluid Glycine and Methylmalonic Acid. *Pediatric Neurology*. 2017;71:65-9.
150. Koufaris C, Alexandrou A, Tanteles GA, Anastasiadou V, Sismani C. A novel HCFC1 variant in male siblings with intellectual disability and microcephaly in the absence of cobalamin disorder. *Biomedical Reports*. 2016;4(2):215-8.
151. Wongkittichote P, Wegner DJ, Shinawi MS. Novel exon-skipping variant disrupting the basic domain of HCFC1 causes intellectual disability without metabolic abnormalities in both male and female patients. *Journal of Human Genetics*. 2021;66(7):717-24.
152. Wang F, Liang L, Ling S, Yu Y, Chen T, Xu F, et al. Clinical characteristics and genotype analysis of five infants with cblX type of methylmalonic acidemia. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban = Journal of Zhejiang University Medical Sciences*. 2022;51(3):298-305.
153. Quintana AM, Yu HC, Brebner A, Pupavac M, Geiger EA, Watson A, et al. Mutations in THAP11 cause an inborn error of cobalamin metabolism and developmental abnormalities. *Hum Mol Genet*. 2017;26(15):2838-49.
154. Dehaene H, Praz V, Lhôte P, Lopes M, Herr W. THAP11F80L cobalamin disorder-associated mutation reveals normal and pathogenic THAP11 functions in gene expression and cell proliferation. *PloS One*. 2020;15(1):e0224646.
155. Pupavac M, Watkins D, Petrella F, Fahiminiya S, Janer A, Cheung W, et al. Inborn Error of Cobalamin Metabolism Associated with the Intracellular Accumulation of Transcobalamin-Bound Cobalamin and Mutations in ZNF143, Which Codes for a Transcriptional Activator. *Human Mutation*. 2016;37(9):976-82.
156. Jusufi J, Suormala T, Burda P, Fowler B, Froese DS, Baumgartner MR. Characterization of functional domains of the cblD (MMADHC) gene product. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 2014;37(5):841-9.
157. Goodman SI, Moe PG, Hammond KB, Mudd SH, Uhlendorf BW. Homocystinuria with methylmalonic aciduria: two cases in a sibship. *Biochemical Medicine*. 1970;4(5):500-15.
158. Suormala T, Baumgartner MR, Coelho D, Zavadakova P, Kozich V, Koch HG, et al. The cblD defect causes either isolated or combined deficiency of methylcobalamin and adenosylcobalamin synthesis. *The Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(41):42742-9.
159. Fofou-Caillierez MaB, Mrabet NT, Chéry C, Dreumont N, Flayac J, Pupavac M, et al. Interaction between methionine synthase isoforms and MMACHC: characterization in cblG-variant, cblG and cblC inherited causes of megaloblastic anaemia. *Human Molecular Genetics*. 2013;22(22):4591-601.
160. Watkins D, Rosenblatt DS. Genetic heterogeneity among patients with methylcobalamin deficiency. Definition of two complementation groups, cblE and cblG. *The Journal of Clinical Investigation*. 1988;81(6):1690-4.
161. Gulati S, Baker P, Li YN, Fowler B, Kruger W, Brody LC, et al. Defects in human methionine synthase in cblG patients. *Human Molecular Genetics*. 1996;5(12):1859-65.

162. Leclerc D, Campeau E, Goyette P, Adjalla CE, Christensen B, Ross M, et al. Human methionine synthase: cDNA cloning and identification of mutations in patients of the cblG complementation group of folate/cobalamin disorders. *Human Molecular Genetics*. 1996;5(12):1867-74.
163. Li YN, Gulati S, Baker PJ, Brody LC, Banerjee R, Kruger WD. Cloning, mapping and RNA analysis of the human methionine synthase gene. *Human Molecular Genetics*. 1996;5(12):1851-8.
164. 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.
165. 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.
166. Leclerc D, 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95(6):3059-64.
167. 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. *American Journal of Human Genetics*. 1998;63(2):409-14.
168. Yamada K, Gravel RA, Toraya T, Matthews RG. Human methionine synthase reductase is a molecular chaperone for human methionine synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(25):9476-81.
169. Huemer M, Bürer C, Ješina P, Kožich V, Landolt MA, Suormala T, et al. Clinical onset and course, response to treatment and outcome in 24 patients with the cblE or cblG remethylation defect complemented by genetic and in vitro enzyme study data. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 2015;38(5):957-67.
170. Zhang J, Dobson CM, Wu X, Lerner-Ellis J, Rosenblatt DS, Gravel RA. Impact of cblB mutations on the function of ATP:cob(I)alamin adenosyltransferase in disorders of vitamin B12 metabolism. *Mol Genet Metab*. 2006;87(4):315-22.
171. Saridakis V, Yakunin A, Xu X, Anandakumar P, Pennycooke M, Gu J, et al. The structural basis for methylmalonic aciduria. The crystal structure of archaeal ATP:cobalamin adenosyltransferase. *J Biol Chem*. 2004;279(22):23646-53.
172. St Maurice M, Mera P, Park K, Brunold TC, Escalante-Semerena JC, Rayment I. Structural characterization of a human-type corrinoid adenosyltransferase confirms that coenzyme B12 is synthesized through a four-coordinate intermediate. *Biochemistry*. 2008;47(21):5755-66.
173. Dobson CM, Wai T, Leclerc D, Wilson A, Wu X, Dore C, et al. Identification of the gene responsible for the cblA complementation group of vitamin B12-responsive methylmalonic acidemia based on analysis of prokaryotic gene arrangements. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(24):15554-9.
174. Ledley FD, Lumetta M, Nguyen PN, Kolhouse JF, Allen RH. Molecular cloning of L-methylmalonyl-CoA mutase: gene transfer and analysis of mut cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988;85(10):3518-21.
175. Ledley FD, Lumetta MR, Zoghbu HY, VanTuinen P, Ledbetter SA, Ledbetter DH. Mapping of human methylmalonyl CoA mutase (MUT) locus on chromosome 6. *Am J Hum Genet*. 1988;42(6):839-46.
176. Sloan J, Carrillo-Carrasco N, Adams D, Venditti CP, Adam MP, Everman DB, et al. Disorders of Intracellular Cobalamin Metabolism. In: Washington Uo, editor. *GeneReviews2021*.

177. Morath MA, Horster F, Sauer SW. Renal dysfunction in methylmalonic acidurias: review for the pediatric nephrologist. *Pediatr Nephrol.* 2013;28(2):227-35.
178. Imbard A, Garcia Segarra N, Tardieu M, Broue P, Bouchereau J, Pichard S, et al. Long-term liver disease in methylmalonic and propionic acidemias. *Mol Genet Metab.* 2018;123(4):433-40.
179. Forny P, Hochuli M, Rahman Y, Deheragoda M, Weber A, Baruteau J, et al. Liver neoplasms in methylmalonic aciduria: An emerging complication. *J Inherit Metab Dis.* 2019;42(5):793-802.
180. Matsui SM, Mahoney MJ, Rosenberg LE. The natural history of the inherited methylmalonic acidemias. *N Engl J Med.* 1983;308(15):857-61.
181. Horster F, Baumgartner MR, Viardot C, Suormala T, Burgard P, Fowler B, et al. Long-term outcome in methylmalonic acidurias is influenced by the underlying defect (mut0, mut-, cblA, cblB). *Pediatr Res.* 2007;62(2):225-30.
182. Cosson MA, Benoist JF, Touati G, Dechaux M, Royer N, Grandin L, et al. Long-term outcome in methylmalonic aciduria: a series of 30 French patients. *Mol Genet Metab.* 2009;97(3):172-8.
183. Baker EH, Sloan JL, Hauser NS, Gropman AL, Adams DR, Toro C, et al. MRI characteristics of globus pallidus infarcts in isolated methylmalonic acidemia. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2015;36(1):194-201.
184. Valayannopoulos V, Baruteau J, Delgado MB, Cano A, Couce ML, Del Toro M, et al. Carglumic acid enhances rapid ammonia detoxification in classical organic acidurias with a favourable risk-benefit profile: a retrospective observational study. *Orphanet J Rare Dis.* 2016;11:32.
185. Niemi AK, Kim IK, Krueger CE, Cowan TM, Baugh N, Farrell R, et al. Treatment of methylmalonic acidemia by liver or combined liver-kidney transplantation. *J Pediatr.* 2015;166(6):1455-61 e1.
186. Brassier A, Krug P, Lacaille F, Pontoizeau C, Krid S, Sissaoui S, et al. Long-term outcome of methylmalonic aciduria after kidney, liver, or combined liver-kidney transplantation: The French experience. *J Inherit Metab Dis.* 2020;43(2):234-43.
187. Marelli C, Fouilhoux A, Benoist JF, De Lonlay P, Guffon-Fouilhoux N, Brassier A, et al. Very long-term outcomes in 23 patients with cblA type methylmalonic acidemia. *J Inherit Metab Dis.* 2022;45(5):937-51.
188. Green R, Allen LH, Bjorke-Monsen AL, Brito A, Gueant JL, Miller JW, et al. Vitamin B12 deficiency. *Nat Rev Dis Primers.* 2017;3:17040.
189. Rosenblatt DS, Cooper BA. Inherited disorders of vitamin B12 metabolism. *Blood reviews.* 1987;1(3):177-82.
190. Froese DS, Gravel RA. Genetic disorders of vitamin B(1)(2) metabolism: eight complementation groups--eight genes. *Expert reviews in molecular medicine.* 2010;12:e37.
191. Oussalah A, Levy J, Berthezene C, Alpers DH, Gueant JL. Health outcomes associated with vegetarian diets: An umbrella review of systematic reviews and meta-analyses. *Clin Nutr.* 2020;39(11):3283-307.
192. Gueant JL, Namour F, Gueant-Rodriguez RM, Daval JL. Folate and fetal programming: a play in epigenomics? *Trends Endocrinol Metab.* 2013;24(6):279-89.
193. Gueant 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 and liver through its role as co-factor of methionine synthase. *Biochimie.* 2013;95(5):1033-40.
194. Froese DS, Fowler B, Baumgartner MR. Vitamin B12, folate, and the methionine remethylation cycle-biochemistry, pathways, and regulation. *Journal of inherited metabolic disease.* 2019;42(4):673-85.

195. Stroup DF, Berlin JA, Morton SC, Olkin I, Williamson GD, Rennie D, et al. Meta-analysis of observational studies in epidemiology: a proposal for reporting. Meta-analysis Of Observational Studies in Epidemiology (MOOSE) group. *JAMA*. 2000;283(15):2008-12.
196. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015;17(5):405-24.
197. Kopanos C, Tsiolkas V, Kouris A, Chapple CE, Albarca Aguilera M, Meyer R, et al. VarSome: the human genomic variant search engine. *Bioinformatics*. 2019;35(11):1978-80.
198. Landrum MJ, Lee JM, Benson M, Brown GR, Chao C, Chitipiralla S, et al. ClinVar: improving access to variant interpretations and supporting evidence. *Nucleic Acids Res*. 2018;46(D1):D1062-D7.
199. Lek M, Karczewski KJ, Minikel EV, Samocha KE, Banks E, Fennell T, et al. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature*. 2016;536(7616):285-91.
200. Mutze U, Walter M, Keller M, Gramer G, Garbade SF, Gleich F, et al. Health Outcomes of Infants with Vitamin B12 Deficiency Identified by Newborn Screening and Early Treated. *The Journal of pediatrics*. 2021;235:42-8.
201. Bundy DAP, de Silva N, Horton S, Patton GC, Schultz L, Jamison DT, et al. Investment in child and adolescent health and development: key messages from Disease Control Priorities, 3rd Edition. *Lancet (London, England)*. 2018;391(10121):687-99.
202. Patton GC, Sawyer SM, Santelli JS, Ross DA, Afifi R, Allen NB, et al. Our future: a Lancet commission on adolescent health and wellbeing. *Lancet (London, England)*. 2016;387(10036):2423-78.
203. Huemer M, Baumgartner MR. The clinical presentation of cobalamin-related disorders: From acquired deficiencies to inborn errors of absorption and intracellular pathways. *Journal of inherited metabolic disease*. 2019;42(4):686-705.
204. Huemer M, Diodato D, Martinelli D, Olivieri G, Blom H, Gleich F, et al. Phenotype, treatment practice and outcome in the cobalamin-dependent remethylation disorders and MTHFR deficiency: Data from the E-HOD registry. *Journal of inherited metabolic disease*. 2019;42(2):333-52.
205. Fofou-Caillierez MB, Mrabet NT, Chery C, Dreumont N, Flayac J, Pupavac M, et al. Interaction between methionine synthase isoforms and MMACHC: characterization in cblG-variant, cblG and cblC inherited causes of megaloblastic anaemia. *Human molecular genetics*. 2013;22(22):4591-601.
206. Bassila C, Ghemrawi R, Flayac J, Froese DS, Baumgartner MR, Gueant JL, et al. Methionine synthase and methionine synthase reductase interact with MMACHC and with MMADHC. *Biochimica et biophysica acta Molecular basis of disease*. 2017;1863(1):103-12.
207. Selhub J, Morris MS, Jacques PF. In vitamin B12 deficiency, higher serum folate is associated with increased total homocysteine and methylmalonic acid concentrations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(50):19995-20000.
208. Douaud G, Refsum H, de Jager CA, Jacoby R, Nichols TE, Smith SM, et al. Preventing Alzheimer's disease-related gray matter atrophy by B-vitamin treatment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(23):9523-8.
209. Smith AD, Smith SM, de Jager CA, Whitbread P, Johnston C, Agacinski G, et al. Homocysteine-lowering by B vitamins slows the rate of accelerated brain atrophy in mild cognitive impairment: a randomized controlled trial. *PloS one*. 2010;5(9):e12244.
210. Battaglia-Hsu SF, Ghemrawi R, Coelho D, Dreumont N, Mosca P, Hergalant S, et al. Inherited disorders of cobalamin metabolism disrupt nucleocytoplasmic transport of mRNA

through impaired methylation/phosphorylation of ELAVL1/HuR. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(15):7844-57.

211. Dreumont N, Mimoun K, Pourie C, Quadros EV, Alberto JM, Umoret R, et al. Glucocorticoid Receptor Activation Restores Learning Memory by Modulating Hippocampal Plasticity in a Mouse Model of Brain Vitamin B12 Deficiency. *Molecular neurobiology.* 2021;58(3):1024-35.

212. Pourie G, Martin N, Daval JL, Alberto JM, Umoret R, Gueant JL, et al. The Stimulation of Neurogenesis Improves the Cognitive Status of Aging Rats Subjected to Gestational and Perinatal Deficiency of B9-12 Vitamins. *International journal of molecular sciences.* 2020;21(21).

213. Kosgei VJ, Coelho D, Gueant-Rodriguez RM, Gueant JL. Sirt1-PPARS Cross-Talk in Complex Metabolic Diseases and Inherited Disorders of the One Carbon Metabolism. *Cells.* 2020;9(8).

214. Bossenmeyer-Pourie C, Smith AD, Lehmann S, Deramecourt V, Sablonniere B, Camadro JM, et al. N-homocysteinylation of tau and MAP1 is increased in autopsy specimens of Alzheimer's disease and vascular dementia. *J Pathol.* 2019;248(3):291-303.

215. Weisfeld-Adams JD, McCourt EA, Diaz GA, Oliver SC. Ocular disease in the cobalamin C defect: a review of the literature and a suggested framework for clinical surveillance. *Molecular genetics and metabolism.* 2015;114(4):537-46.

216. Matmat K, Gueant-Rodriguez RM, Oussalah A, Wiedemann-Fode A, Dionisi-Vici C, Coelho D, et al. Ocular manifestations in patients with inborn errors of intracellular cobalamin metabolism: a systematic review. *Human genetics.* 2021.

217. Eikelboom JW, Lonn E, Genest J, Jr., Hankey G, Yusuf S. Homocyst(e)ine and cardiovascular disease: a critical review of the epidemiologic evidence. *Annals of internal medicine.* 1999;131(5):363-75.

218. Levy J, Rodriguez-Gueant RM, Oussalah A, Jeannesson E, Wahl D, Ziuly S, et al. Cardiovascular manifestations of intermediate and major hyperhomocysteinemia due to vitamin B12 and folate deficiency and/or inherited disorders of one-carbon metabolism: a 3.5-year retrospective cross-sectional study of consecutive patients. *The American journal of clinical nutrition.* 2021.

219. Psara E, Pentieva K, Ward M, McNulty H. Critical review of nutrition, blood pressure and risk of hypertension through the lifecycle: do B vitamins play a role? *Biochimie.* 2020;173:76-90.

220. McNulty H, Dowey le RC, Strain JJ, Dunne A, Ward M, Molloy AM, et al. Riboflavin lowers homocysteine in individuals homozygous for the MTHFR 677C->T polymorphism. *Circulation.* 2006;113(1):74-80.

221. Balint B, Jepchumba VK, Gueant JL, Gueant-Rodriguez RM. Mechanisms of homocysteine-induced damage to the endothelial, medial and adventitial layers of the arterial wall. *Biochimie.* 2020;173:100-6.

222. Chen G, Broseus J, Hergalant S, Donnart A, Chevalier C, Bolanos-Jimenez F, et al. Identification of master genes involved in liver key functions through transcriptomics and epigenomics of methyl donor deficiency in rat: relevance to nonalcoholic liver disease. *Mol Nutr Food Res.* 2015;59(2):293-302.

223. Li Z, Kosgei VJ, Bison A, Alberto JM, Umoret R, Maskali F, et al. Programming by Methyl Donor Deficiency during Pregnancy and Lactation Produces Cardiomyopathy in Adult Rats Subjected to High Fat Diet. *Molecular nutrition & food research.* 2021;65(13):e2100065.

224. Balint B, Hergalant S, Camadro JM, Blaise S, Vanalderwiert L, Lignières L, et al. Fetal programming by methyl donor deficiency produces aorta remodeling with homocysteinylation of extracellular matrix proteins and elastin breaks. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2021.

225. Ktena YP, Paul SM, Hauser NS, Sloan JL, Gropman A, Manoli I, et al. Delineating the spectrum of impairments, disabilities, and rehabilitation needs in methylmalonic acidemia (MMA). *American journal of medical genetics Part A*. 2015;167a(9):2075-84.
226. Chandler RJ, Sloan J, Fu H, Tsai M, Stabler S, Allen R, et al. Metabolic phenotype of methylmalonic acidemia in mice and humans: the role of skeletal muscle. *BMC medical genetics*. 2007;8:64.
227. Peters H, Nefedov M, Sarsero J, Pitt J, Fowler KJ, Gazeas S, et al. A knock-out mouse model for methylmalonic aciduria resulting in neonatal lethality. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(52):52909-13.
228. Forny P, Schumann A, Mustedanagic M, Mathis D, Wulf MA, Nagele N, et al. Novel Mouse Models of Methylmalonic Aciduria Recapitulate Phenotypic Traits with a Genetic Dosage Effect. *The Journal of biological chemistry*. 2016;291(39):20563-73.
229. Lucienne M, Aguilar-Pimentel JA, Amarie OV, Becker L, Calzada-Wack J, da Silva-Buttkus P, et al. In-depth phenotyping reveals common and novel disease symptoms in a hemizygous knock-in mouse model (Mut-ko/ki) of mut-type methylmalonic aciduria. *Biochimica et biophysica acta Molecular basis of disease*. 2020;1866(3):165622.
230. Gueant JL, Chery C, Namour F, Aimone-Gastin I, Wustinger M. Decreased affinity of urinary intrinsic factor-cobalamin receptor in a case of Grasbeck-Imerslund syndrome. *Gastroenterology*. 1999;116(5):1274-6.
231. Gueant JL, Saunier M, Gastin I, Safi A, Lamireau T, Duclos B, et al. Decreased activity of intestinal and urinary intrinsic factor receptor in Grasbeck-Imerslund disease [corrected]. *Gastroenterology*. 1995;108(6):1622-8.
232. 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.
233. Watkins D, Rosenblatt DS. Lessons in biology from patients with inherited disorders of vitamin B12 and folate metabolism. *Biochimie*. 2016;126:3-5.
234. Watkins D, Rosenblatt DS. Inherited defects of cobalamin metabolism. *Vitamins and hormones*. 2022;119:355-76.
235. Chern T, Achilleos A, Tong X, Hill MC, Saltzman AB, Reineke LC, et al. Mutations in *Hcfc1* and *Ronin* result in an inborn error of cobalamin metabolism and ribosomopathy. *Nature communications*. 2022;13(1):134.
236. Oussalah A, Siblino Y, Hergalant S, Chery C, Rouyer P, Cavicchi C, et al. Epimutations in both the *TESK2* and *MMACHC* promoters in the Epi-cblC inherited disorder of intracellular metabolism of vitamin B12. *Clin Epigenetics (In press)*. 2022.
237. Gueant JL, Siblino Y, Chery C, Schmitt G, Gueant-Rodriguez RM, Coelho D, et al. Epimutation in inherited metabolic disorders: the influence of aberrant transcription in adjacent genes. *Human genetics*. 2022.
238. Juni P, Holenstein F, Sterne J, Bartlett C, Egger M. Direction and impact of language bias in meta-analyses of controlled trials: empirical study. *Int J Epidemiol*. 2002;31(1):115-23.
239. Marshall IJ, Wallace BC. Toward systematic review automation: a practical guide to using machine learning tools in research synthesis. *Syst Rev*. 2019;8(1):163.
240. Gilbert W, Maxam A. The nucleotide sequence of the lac operator. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1973;70(12):3581-4.
241. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977;74(12):5463-7.
242. Bai X, Edwards J, Ju J. Molecular engineering approaches for DNA sequencing and analysis. *Expert Rev Mol Diagn*. 2005;5(5):797-808.

243. Harris SR, Feil EJ, Holden MT, Quail MA, Nickerson EK, Chantratita N, et al. Evolution of MRSA during hospital transmission and intercontinental spread. *Science*. 2010;327(5964):469-74.
244. Metzker ML. Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet*. 2010;11(1):31-46.
245. Kingsmore SF, Saunders CJ. Deep sequencing of patient genomes for disease diagnosis: when will it become routine? *Sci Transl Med*. 2011;3(87):87ps23.
246. Ronaghi M, Uhlen M, Nyren P. A sequencing method based on real-time pyrophosphate. *Science*. 1998;281(5375):363, 5.
247. Shendure J, Porreca GJ, Reppas NB, Lin X, McCutcheon JP, Rosenbaum AM, et al. Accurate multiplex polony sequencing of an evolved bacterial genome. *Science*. 2005;309(5741):1728-32.
248. Rothberg JM, Hinz W, Rearick TM, Schultz J, Mileski W, Davey M, et al. An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature*. 2011;475(7356):348-52.
249. Facio FM, Lee K, O'Daniel JM. A genetic counselor's guide to using next-generation sequencing in clinical practice. *J Genet Couns*. 2014;23(4):455-62.
250. Swanson A, Ramos E, Snyder H. Next Generation sequencing is the impetus for the next generation of laboratory-based genetic counselors. *J Genet Couns*. 2014;23(4):647-54.
251. Muzzey D, Evans EA, Lieber C. Understanding the Basics of NGS: From Mechanism to Variant Calling. *Curr Genet Med Rep*. 2015;3(4):158-65.
252. Matthijs G, Souche E, Alders M, Corveleyn A, Eck S, Feenstra I, et al. Guidelines for diagnostic next-generation sequencing. *Eur J Hum Genet*. 2016;24(1):2-5.
253. Adams DR, Eng CM. Next-Generation Sequencing to Diagnose Suspected Genetic Disorders. *N Engl J Med*. 2018;379(14):1353-62.
254. van Ingen J, Kohl TA, Kranzer K, Hasse B, Keller PM, Katarzyna Szafranska A, et al. Global outbreak of severe *Mycobacterium chimaera* disease after cardiac surgery: a molecular epidemiological study. *Lancet Infect Dis*. 2017;17(10):1033-41.
255. Sinclair A, Arnold C, Woodford N. Rapid detection and estimation by pyrosequencing of 23S rRNA genes with a single nucleotide polymorphism conferring linezolid resistance in Enterococci. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;47(11):3620-2.
256. Stratton MR, Campbell PJ, Futreal PA. The cancer genome. *Nature*. 2009;458(7239):719-24.
257. Longo DL. Tumor heterogeneity and personalized medicine. *N Engl J Med*. 2012;366(10):956-7.
258. Kline CN, Joseph NM, Grenert JP, van Ziffle J, Talevich E, Onodera C, et al. Targeted next-generation sequencing of pediatric neuro-oncology patients improves diagnosis, identifies pathogenic germline mutations, and directs targeted therapy. *Neuro Oncol*. 2017;19(5):699-709.
259. Todd EJ, Yau KS, Ong R, Slee J, McGillivray G, Barnett CP, et al. Next generation sequencing in a large cohort of patients presenting with neuromuscular disease before or at birth. *Orphanet J Rare Dis*. 2015;10:148.
260. Chiu RW, Chan KC, Gao Y, Lau VY, Zheng W, Leung TY, et al. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidy by massively parallel genomic sequencing of DNA in maternal plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(51):20458-63.
261. Stefanski A, Calle-Lopez Y, Leu C, Perez-Palma E, Pestana-Knight E, Lal D. Clinical sequencing yield in epilepsy, autism spectrum disorder, and intellectual disability: A systematic review and meta-analysis. *Epilepsia*. 2021;62(1):143-51.
262. Symonds JD, McTague A. Epilepsy and developmental disorders: Next generation sequencing in the clinic. *Eur J Paediatr Neurol*. 2020;24:15-23.

263. Blazekovic A, Gotovac Jercic K, Meglaj S, Duranovic V, Prpic I, Lozic B, et al. Genetics of Pediatric Epilepsy: Next-Generation Sequencing in Clinical Practice. *Genes (Basel)*. 2022;13(8).
264. Eker D, Gurkan H, Karal Y, Yalcintepe S, Demir S, Atli E, et al. Investigating the Genetic Etiology of Pediatric Patients with Peripheral Hypotonia Using the Next-Generation Sequencing Method. *Glob Med Genet*. 2022;9(3):200-7.
265. Wang Y, Peng W, Guo HY, Li H, Tian J, Shi YJ, et al. Next-generation sequencing-based molecular diagnosis of neonatal hypotonia in Chinese Population. *Sci Rep*. 2016;6:29088.
266. Wu L, Brady L, Shoffner J, Tarnopolsky MA. Next-Generation Sequencing to Diagnose Muscular Dystrophy, Rhabdomyolysis, and HyperCKemia. *Can J Neurol Sci*. 2018;45(3):262-8.
267. Zhou Q, Huang H, Ma L, Zhu T. The Application of Next-Generation Sequencing (NGS) in Neonatal-Onset Urea Cycle Disorders (UCDs): Clinical Course, Metabolomic Profiling, and Genetic Findings in Nine Chinese Hyperammonemia Patients. *Biomed Res Int*. 2020;2020:5690915.
268. La Cognata V, Cavallaro S. A Comprehensive, Targeted NGS Approach to Assessing Molecular Diagnosis of Lysosomal Storage Diseases. *Genes (Basel)*. 2021;12(11).
269. Taylor J, Craft J, Blair E, Wordsworth S, Beeson D, Chandratre S, et al. Implementation of a genomic medicine multi-disciplinary team approach for rare disease in the clinical setting: a prospective exome sequencing case series. *Genome Med*. 2019;11(1):46.
270. Baldrige D, Wangler MF, Bowman AN, Yamamoto S, Undiagnosed Diseases N, Schedl T, et al. Model organisms contribute to diagnosis and discovery in the undiagnosed diseases network: current state and a future vision. *Orphanet J Rare Dis*. 2021;16(1):206.
271. Ediae GU, Lemire G, Chisholm C, Hartley T, Eaton A, Osmond M, et al. The implementation of an enhanced clinical model to improve the diagnostic yield of exome sequencing for patients with a rare genetic disease: A Canadian experience. *Am J Med Genet A*. 2023;191(2):338-47.
272. Lee H, Deignan JL, Dorrani N, Strom SP, Kantarci S, Quintero-Rivera F, et al. Clinical exome sequencing for genetic identification of rare Mendelian disorders. *Jama*. 2014;312(18):1880-7.
273. Vega AI, Medrano C, Navarrete R, Desviat LR, Merinero B, Rodríguez-Pombo P, et al. Molecular diagnosis of glycogen storage disease and disorders with overlapping clinical symptoms by massive parallel sequencing. *Genet Med*. 2016;18(10):1037-43.
274. Chérot E, Keren B, Dubourg C, Carré W, Fradin M, Lavillaureix A, et al. Using medical exome sequencing to identify the causes of neurodevelopmental disorders: Experience of 2 clinical units and 216 patients. *Clin Genet*. 2018;93(3):567-76.
275. Kirk EP, Barlow-Stewart K, Selvanathan A, Josephi-Taylor S, Worgan L, Rajagopalan S, et al. Beyond the panel: preconception screening in consanguineous couples using the TruSight One "clinical exome". *Genet Med*. 2019;21(3):608-12.
276. Anikster Y, Haack TB, Vilboux T, Pode-Shakked B, Thony B, Shen N, et al. Biallelic Mutations in DNAJC12 Cause Hyperphenylalaninemia, Dystonia, and Intellectual Disability. *Am J Hum Genet*. 2017;100(2):257-66.
277. Haack TB, Danhauser K, Haberberger B, Hoser J, Strecker V, Boehm D, et al. Exome sequencing identifies ACAD9 mutations as a cause of complex I deficiency. *Nat Genet*. 2010;42(12):1131-4.
278. Taylor RW, Pyle A, Griffin H, Blakely EL, Duff J, He L, et al. Use of whole-exome sequencing to determine the genetic basis of multiple mitochondrial respiratory chain complex deficiencies. *JAMA*. 2014;312(1):68-77.

279. Vissers LE, de Ligt J, Gilissen C, Janssen I, Steehouwer M, de Vries P, et al. A de novo paradigm for mental retardation. *Nat Genet.* 2010;42(12):1109-12.
280. Harripaul R, Vasli N, Mikhailov A, Rafiq MA, Mittal K, Windpassinger C, et al. Mapping autosomal recessive intellectual disability: combined microarray and exome sequencing identifies 26 novel candidate genes in 192 consanguineous families. *Mol Psychiatry.* 2018;23(4):973-84.
281. Cossins J, Belaya K, Hicks D, Salih MA, Finlayson S, Carboni N, et al. Congenital myasthenic syndromes due to mutations in ALG2 and ALG14. *Brain.* 2013;136(Pt 3):944-56.
282. Chardon JW, Smith AC, Woulfe J, Pena E, Rakhra K, Dennie C, et al. LIMS2 mutations are associated with a novel muscular dystrophy, severe cardiomyopathy and triangular tongues. *Clin Genet.* 2015;88(6):558-64.
283. Saudubray JM, Garcia-Cazorla A. Inborn Errors of Metabolism Overview: Pathophysiology, Manifestations, Evaluation, and Management. *Pediatr Clin North Am.* 2018;65(2):179-208.
284. Vernon HJ. Inborn Errors of Metabolism: Advances in Diagnosis and Therapy. *JAMA Pediatr.* 2015;169(8):778-82.
285. Fukao T, Nakamura K. Advances in inborn errors of metabolism. *J Hum Genet.* 2019;64(2):65.
286. Oussalah A, Jeannesson-Thivisol E, Chery C, Perrin P, Rouyer P, Josse T, et al. Population and evolutionary genetics of the PAH locus to uncover overdominance and adaptive mechanisms in phenylketonuria: Results from a multiethnic study. *EBioMedicine.* 2020;51:102623.
287. Wiedemann A, Chery C, Coelho D, Flayac J, Gueguen N, Desquirit-Dumas V, et al. Mutations in MTHFR and POLG impaired activity of the mitochondrial respiratory chain in 46-year-old twins with spastic paraparesis. *Journal of human genetics.* 2020;65(2):91-8.
288. Renard E, Chery C, Oussalah A, Josse T, Perrin P, Tramoy D, et al. Exome sequencing of cases with neural tube defects identifies candidate genes involved in one-carbon/vitamin B12 metabolisms and Sonic Hedgehog pathway. *Hum Genet.* 2019;138(7):703-13.
289. Van der Auwera GA, Carneiro MO, Hartl C, Poplin R, Del Angel G, Levy-Moonshine A, et al. From FastQ data to high confidence variant calls: the Genome Analysis Toolkit best practices pipeline. *Curr Protoc Bioinformatics.* 2013;43:11 0 1- 0 33.
290. Singleton MV, Guthery SL, Voelkerding KV, Chen K, Kennedy B, Margraf RL, et al. Phevor combines multiple biomedical ontologies for accurate identification of disease-causing alleles in single individuals and small nuclear families. *Am J Hum Genet.* 2014;94(4):599-610.
291. Schwarz JM, Cooper DN, Schuelke M, Seelow D. MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nat Methods.* 2014;11(4):361-2.
292. Shihab HA, Gough J, Cooper DN, Stenson PD, Barker GL, Edwards KJ, et al. Predicting the functional, molecular, and phenotypic consequences of amino acid substitutions using hidden Markov models. *Hum Mutat.* 2013;34(1):57-65.
293. Dong C, Wei P, Jian X, Gibbs R, Boerwinkle E, Wang K, et al. Comparison and integration of deleteriousness prediction methods for nonsynonymous SNVs in whole exome sequencing studies. *Hum Mol Genet.* 2015;24(8):2125-37.
294. Kumar P, Henikoff S, Ng PC. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat Protoc.* 2009;4(7):1073-81.
295. Choi Y, Chan AP. PROVEAN web server: a tool to predict the functional effect of amino acid substitutions and indels. *Bioinformatics.* 2015;31(16):2745-7.
296. Quang D, Chen Y, Xie X. DANN: a deep learning approach for annotating the pathogenicity of genetic variants. *Bioinformatics.* 2015;31(5):761-3.
297. Amberger JS, Bocchini CA, Scott AF, Hamosh A. OMIM.org: leveraging knowledge across phenotype-gene relationships. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(D1):D1038-D43.

298. Sparks TN, Lianoglou BR, Adami RR, Pluym ID, Holliman K, Duffy J, et al. Exome Sequencing for Prenatal Diagnosis in Nonimmune Hydrops Fetalis. *N Engl J Med*. 2020;383(18):1746-56.
299. Australian Genomics Health Alliance Acute Care F, Lunke S, Eggers S, Wilson M, Patel C, Barnett CP, et al. Feasibility of Ultra-Rapid Exome Sequencing in Critically Ill Infants and Children With Suspected Monogenic Conditions in the Australian Public Health Care System. *JAMA*. 2020;323(24):2503-11.
300. Lord J, McMullan DJ, Eberhardt RY, Rinck G, Hamilton SJ, Quinlan-Jones E, et al. Prenatal exome sequencing analysis in fetal structural anomalies detected by ultrasonography (PAGE): a cohort study. *Lancet (London, England)*. 2019;393(10173):747-57.
301. Groopman EE, Marasa M, Cameron-Christie S, Petrovski S, Aggarwal VS, Milo-Rasouly H, et al. Diagnostic Utility of Exome Sequencing for Kidney Disease. *N Engl J Med*. 2019;380(2):142-51.
302. Tarailo-Graovac M, Shyr C, Ross CJ, Horvath GA, Salvarinova R, Ye XC, et al. Exome Sequencing and the Management of Neurometabolic Disorders. *N Engl J Med*. 2016;374(23):2246-55.
303. Rauch A, Wieczorek D, Graf E, Wieland T, Ende S, Schwarzmayer T, et al. Range of genetic mutations associated with severe non-syndromic sporadic intellectual disability: an exome sequencing study. *Lancet (London, England)*. 2012;380(9854):1674-82.
304. de Ligt J, Willemsen MH, van Bon BW, Kleefstra T, Yntema HG, Kroes T, et al. Diagnostic exome sequencing in persons with severe intellectual disability. *N Engl J Med*. 2012;367(20):1921-9.
305. Deciphering Developmental Disorders S. Large-scale discovery of novel genetic causes of developmental disorders. *Nature*. 2015;519(7542):223-8.
306. Yang Y, Muzny DM, Reid JG, Bainbridge MN, Willis A, Ward PA, et al. Clinical whole-exome sequencing for the diagnosis of mendelian disorders. *N Engl J Med*. 2013;369(16):1502-11.
307. Petrovski S, Aggarwal V, Giordano JL, Stosic M, Wou K, Bier L, et al. Whole-exome sequencing in the evaluation of fetal structural anomalies: a prospective cohort study. *Lancet (London, England)*. 2019;393(10173):758-67.
308. Dewey FE, Grove ME, Pan C, Goldstein BA, Bernstein JA, Chaib H, et al. Clinical interpretation and implications of whole-genome sequencing. *Jama*. 2014;311(10):1035-45.
309. Lupski JR, Reid JG, Gonzaga-Jauregui C, Rio Deiros D, Chen DC, Nazareth L, et al. Whole-genome sequencing in a patient with Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *N Engl J Med*. 2010;362(13):1181-91.
310. Meng L, Pammi M, Saronwala A, Magoulas P, Ghazi AR, Vetrini F, et al. Use of Exome Sequencing for Infants in Intensive Care Units: Ascertainment of Severe Single-Gene Disorders and Effect on Medical Management. *JAMA Pediatr*. 2017;171(12):e173438.
311. Ganapathy A, Mishra A, Soni MR, Kumar P, Sadagopan M, Kanthi AV, et al. Multi-gene testing in neurological disorders showed an improved diagnostic yield: data from over 1000 Indian patients. *J Neurol*. 2019;266(8):1919-26.
312. Marques Matos C, Alonso I, Leao M. Diagnostic yield of next-generation sequencing applied to neurological disorders. *J Clin Neurosci*. 2019;67:14-8.
313. Madhuri V, Selina A, Loganathan L, Kumar A, Kumar V, Raymond R, et al. Osteogenesis imperfecta: Novel genetic variants and clinical observations from a clinical exome study of 54 Indian patients. *Ann Hum Genet*. 2021;85(1):37-46.
314. Yubero D, Brandi N, Ormazabal A, Garcia-Cazorla A, Perez-Duenas B, Campistol J, et al. Targeted Next Generation Sequencing in Patients with Inborn Errors of Metabolism. *PLoS One*. 2016;11(5):e0156359.

315. Lionel AC, Costain G, Monfared N, Walker S, Reuter MS, Hosseini SM, et al. Improved diagnostic yield compared with targeted gene sequencing panels suggests a role for whole-genome sequencing as a first-tier genetic test. *Genet Med*. 2018;20(4):435-43.
316. Ghemrawi R, Pooya S, Lorentz S, Gauchotte G, Arnold C, Gueant JL, et al. Decreased vitamin B12 availability induces ER stress through impaired SIRT1-deacetylation of HSF1. *Cell Death Dis*. 2013;4(3):e553.
317. Ghemrawi R, Arnold C, Battaglia-Hsu SF, Pourie G, Trinh I, Bassila C, et al. SIRT1 activation rescues the mislocalization of RNA-binding proteins and cognitive defects induced by inherited cobalamin disorders. *Metabolism*. 2019;101:153992.
318. Czerska M, Mikolajewska K, Zielinski M, Gromadzinska J, Wasowicz W. Today's oxidative stress markers. *Med Pr*. 2015;66(3):393-405.
319. Pisoschi AM, Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur J Med Chem*. 2015;97:55-74.
320. van de Lagemaat EE, de Groot L, van den Heuvel E. Vitamin B(12) in Relation to Oxidative Stress: A Systematic Review. *Nutrients*. 2019;11(2).
321. Di Meo S, Reed TT, Venditti P, Victor VM. Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:1245049.
322. Voigt A, Rahnefeld A, Kloetzel PM, Kruger E. Cytokine-induced oxidative stress in cardiac inflammation and heart failure-how the ubiquitin proteasome system targets this vicious cycle. *Front Physiol*. 2013;4:42.
323. Watters JL, Satia JA, da Costa KA, Boysen G, Collins LB, Morrow JD, et al. Comparison of three oxidative stress biomarkers in a sample of healthy adults. *Biomarkers*. 2009;14(8):587-95.
324. Valko M, Jomova K, Rhodes CJ, Kuca K, Musilek K. Redox- and non-redox-metal-induced formation of free radicals and their role in human disease. *Arch Toxicol*. 2016;90(1):1-37.
325. Filomeni G, De Zio D, Cecconi F. Oxidative stress and autophagy: the clash between damage and metabolic needs. *Cell Death Differ*. 2015;22(3):377-88.
326. Kattoor AJ, Pothineni NVK, Palagiri D, Mehta JL. Oxidative Stress in Atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep*. 2017;19(11):42.
327. Tonnes E, Trushina E. Oxidative Stress, Synaptic Dysfunction, and Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*. 2017;57(4):1105-21.
328. Daenen K, Andries A, Mekahli D, Van Schepdael A, Jouret F, Bammens B. Oxidative stress in chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol*. 2019;34(6):975-91.
329. Jelic MD, Mandic AD, Maricic SM, Srdjenovic BU. Oxidative stress and its role in cancer. *J Cancer Res Ther*. 2021;17(1):22-8.
330. McCaddon A, Regland B, Hudson P, Davies G. Functional vitamin B(12) deficiency and Alzheimer disease. *Neurology*. 2002;58(9):1395-9.
331. McCaddon A. Vitamin B12 in neurology and ageing; clinical and genetic aspects. *Biochimie*. 2013;95(5):1066-76.
332. Rozycka A, Jagodzinski PP, Kozubski W, Lianeri M, Dorszewska J. Homocysteine Level and Mechanisms of Injury in Parkinson's Disease as Related to MTHFR, MTR, and MTHFD1 Genes Polymorphisms and L-Dopa Treatment. *Curr Genomics*. 2013;14(8):534-42.
333. Firth J, Stubbs B, Sarris J, Rosenbaum S, Teasdale S, Berk M, et al. The effects of vitamin and mineral supplementation on symptoms of schizophrenia: a systematic review and meta-analysis. *Psychol Med*. 2017;47(9):1515-27.
334. Ames BN. Low micronutrient intake may accelerate the degenerative diseases of aging through allocation of scarce micronutrients by triage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(47):17589-94.

335. Brito A, Grapov D, Fahrmann J, Harvey D, Green R, Miller JW, et al. The Human Serum Metabolome of Vitamin B-12 Deficiency and Repletion, and Associations with Neurological Function in Elderly Adults. *J Nutr.* 2017;147(10):1839-49.
336. Moreira ES, Brasch NE, Yun J. Vitamin B12 protects against superoxide-induced cell injury in human aortic endothelial cells. *Free Radic Biol Med.* 2011;51(4):876-83.
337. Chan W, Almasieh M, Catrinescu MM, Levin LA. Cobalamin-Associated Superoxide Scavenging in Neuronal Cells Is a Potential Mechanism for Vitamin B(12)-Deprivation Optic Neuropathy. *Am J Pathol.* 2018;188(1):160-72.
338. Karamshetty V, Acharya JD, Ghaskadbi S, Goel P. Mathematical Modeling of Glutathione Status in Type 2 Diabetics with Vitamin B12 Deficiency. *Front Cell Dev Biol.* 2016;4:16.
339. Politis A, Olgiati P, Malitas P, Albani D, Signorini A, Polito L, et al. Vitamin B12 levels in Alzheimer's disease: association with clinical features and cytokine production. *J Alzheimers Dis.* 2010;19(2):481-8.
340. Birch CS, Brasch NE, McCaddon A, Williams JH. A novel role for vitamin B(12): Cobalamins are intracellular antioxidants in vitro. *Free Radic Biol Med.* 2009;47(2):184-8.
341. Tyagi N, Sedoris KC, Steed M, Ovechkin AV, Moshal KS, Tyagi SC. Mechanisms of homocysteine-induced oxidative stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005;289(6):H2649-56.
342. Loscalzo J. The oxidant stress of hyperhomocyst(e)inemia. *J Clin Invest.* 1996;98(1):5-7.
343. Obeid R, Shannan B, Herrmann W. Advanced glycation end products overload might explain intracellular cobalamin deficiency in renal dysfunction, diabetes and aging. *Med Hypotheses.* 2011;77(5):884-8.
344. Richard E, Jorge-Finnigan A, Garcia-Villoria J, Merinero B, Desviat LR, Gort L, et al. Genetic and cellular studies of oxidative stress in methylmalonic aciduria (MMA) cobalamin deficiency type C (cblC) with homocystinuria (MMACHC). *Hum Mutat.* 2009;30(11):1558-66.
345. Jorge-Finnigan A, Gamez A, Perez B, Ugarte M, Richard E. Different altered pattern expression of genes related to apoptosis in isolated methylmalonic aciduria cblB type and combined with homocystinuria cblC type. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1802(11):959-67.
346. Richard E, Desviat LR, Ugarte M, Perez B. Oxidative stress and apoptosis in homocystinuria patients with genetic remethylation defects. *J Cell Biochem.* 2013;114(1):183-91.
347. Pastore A, Martinelli D, Piemonte F, Tozzi G, Boenzi S, Di Giovamberardino G, et al. Glutathione metabolism in cobalamin deficiency type C (cblC). *J Inherit Metab Dis.* 2014;37(1):125-9.
348. Costanzo M, Caterino M, Cevenini A, Jung V, Chhuon C, Lipecka J, et al. Proteomics Reveals that Methylmalonyl-CoA Mutase Modulates Cell Architecture and Increases Susceptibility to Stress. *Int J Mol Sci.* 2020;21(14).
349. Luciani A, Schumann A, Berquez M, Chen Z, Nieri D, Failli M, et al. Impaired mitophagy links mitochondrial disease to epithelial stress in methylmalonyl-CoA mutase deficiency. *Nat Commun.* 2020;11(1):970.
350. Luciani A, Denley MCS, Govers LP, Sorrentino V, Froese DS. Mitochondrial disease, mitophagy, and cellular distress in methylmalonic acidemia. *Cell Mol Life Sci.* 2021;78(21-22):6851-67.
351. Manoli I, Sysol JR, Li L, Houillier P, Garone C, Wang C, et al. Targeting proximal tubule mitochondrial dysfunction attenuates the renal disease of methylmalonic acidemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(33):13552-7.

352. Manoli I, Sysol JR, Epping MW, Li L, Wang C, Sloan JL, et al. FGF21 underlies a hormetic response to metabolic stress in methylmalonic acidemia. *JCI Insight*. 2018;3(23).
353. Ruppert T, Schumann A, Grone HJ, Okun JG, Kolker S, Morath MA, et al. Molecular and biochemical alterations in tubular epithelial cells of patients with isolated methylmalonic aciduria. *Hum Mol Genet*. 2015;24(24):7049-59.
354. Chen Z, Berquez M, Luciani A. Mitochondria, mitophagy, and metabolic disease: towards assembling the puzzle. *Cell Stress*. 2020;4(6):147-50.
355. Hetz C, Zhang K, Kaufman RJ. Mechanisms, regulation and functions of the unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2020;21(8):421-38.
356. Hebert DN, Molinari M. In and out of the ER: protein folding, quality control, degradation, and related human diseases. *Physiol Rev*. 2007;87(4):1377-408.
357. Frye RA. Phylogenetic classification of prokaryotic and eukaryotic Sir2-like proteins. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;273(2):793-8.
358. Tanno M, Sakamoto J, Miura T, Shimamoto K, Horio Y. Nucleocytoplasmic shuttling of the NAD⁺-dependent histone deacetylase SIRT1. *J Biol Chem*. 2007;282(9):6823-32.
359. Landry J, Sutton A, Tafrov ST, Heller RC, Stebbins J, Pillus L, et al. The silencing protein SIR2 and its homologs are NAD-dependent protein deacetylases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(11):5807-11.
360. Canto C, Auwerx J. Caloric restriction, SIRT1 and longevity. *Trends Endocrinol Metab*. 2009;20(7):325-31.
361. Li X. SIRT1 and energy metabolism. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2013;45(1):51-60.
362. Houtkooper RH, Canto C, Wanders RJ, Auwerx J. The secret life of NAD⁺: an old metabolite controlling new metabolic signaling pathways. *Endocr Rev*. 2010;31(2):194-223.
363. Read A, Schroder M. The Unfolded Protein Response: An Overview. *Biology (Basel)*. 2021;10(5).
364. Raynes R, Pombier KM, Nguyen K, Brunquell J, Mendez JE, Westerheide SD. The SIRT1 modulators AROS and DBC1 regulate HSF1 activity and the heat shock response. *PLoS One*. 2013;8(1):e54364.
365. Pooya S, Blaise S, Moreno Garcia M, Giudicelli J, Alberto JM, Gueant-Rodriguez RM, et al. Methyl donor deficiency impairs fatty acid oxidation through PGC-1alpha hypomethylation and decreased ER-alpha, ERR-alpha, and HNF-4alpha in the rat liver. *J Hepatol*. 2012;57(2):344-51.
366. Garcia MM, Gueant-Rodriguez RM, Pooya S, Brachet P, Alberto JM, Jeannesson E, et al. Methyl donor deficiency induces cardiomyopathy through altered methylation/acetylation of PGC-1alpha by PRMT1 and SIRT1. *J Pathol*. 2011;225(3):324-35.
367. Pourie G, Martin N, Bossenmeyer-Pourie C, Akchiche N, Gueant-Rodriguez RM, Geoffroy A, et al. Folate- and vitamin B12-deficient diet during gestation and lactation alters cerebellar synapsin expression via impaired influence of estrogen nuclear receptor alpha. *FASEB J*. 2015;29(9):3713-25.
368. Bison A, Marchal-Bressenot A, Li Z, Elamouri I, Feigerlova E, Peng L, et al. Foetal programming by methyl donor deficiency produces steato-hepatitis in rats exposed to high fat diet. *Sci Rep*. 2016;6:37207.
369. Feigerlova E, Demarquet L, Melhem H, Ghemrawi R, Battaglia-Hsu SF, Ewu E, et al. Methyl donor deficiency impairs bone development via peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha-dependent vitamin D receptor pathway. *FASEB J*. 2016;30(10):3598-612.
370. Pereira B, Billaud M, Almeida R. RNA-Binding Proteins in Cancer: Old Players and New Actors. *Trends Cancer*. 2017;3(7):506-28.

371. Lukong KE, Chang KW, Khandjian EW, Richard S. RNA-binding proteins in human genetic disease. *Trends Genet.* 2008;24(8):416-25.
372. Ma WJ, Cheng S, Campbell C, Wright A, Furneaux H. Cloning and characterization of HuR, a ubiquitously expressed Elav-like protein. *J Biol Chem.* 1996;271(14):8144-51.
373. Hinman MN, Lou H. Diverse molecular functions of Hu proteins. *Cell Mol Life Sci.* 2008;65(20):3168-81.
374. Schultz CW, Preet R, Dhir T, Dixon DA, Brody JR. Understanding and targeting the disease-related RNA binding protein human antigen R (HuR). *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 2020;11(3):e1581.
375. Grammatikakis I, Abdelmohsen K, Gorospe M. Posttranslational control of HuR function. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 2017;8(1).
376. Rashka C, Hergalant S, Dreumont N, Oussalah A, Camadro JM, Marchand V, et al. Analysis of fibroblasts from patients with cblC and cblG genetic defects of cobalamin metabolism reveals global dysregulation of alternative splicing. *Hum Mol Genet.* 2020;29(12):1969-85.
377. Dredge BK, Polydorides AD, Darnell RB. The splice of life: alternative splicing and neurological disease. *Nat Rev Neurosci.* 2001;2(1):43-50.
378. Parikshak NN, Swarup V, Belgard TG, Irimia M, Ramaswami G, Gandal MJ, et al. Genome-wide changes in lncRNA, splicing, and regional gene expression patterns in autism. *Nature.* 2016;540(7633):423-7.
379. Jones PA. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev Genet.* 2012;13(7):484-92.
380. Turner MA, Yang X, Yin D, Kuczera K, Borchardt RT, Howell PL. Structure and function of S-adenosylhomocysteine hydrolase. *Cell Biochem Biophys.* 2000;33(2):101-25.
381. Xiao Y, Su X, Huang W, Zhang J, Peng C, Huang H, et al. Role of S-adenosylhomocysteine in cardiovascular disease and its potential epigenetic mechanism. *Int J Biochem Cell Biol.* 2015;67:158-66.
382. Perla-Kajan J, Jakubowski H. Dysregulation of Epigenetic Mechanisms of Gene Expression in the Pathologies of Hyperhomocysteinemia. *Int J Mol Sci.* 2019;20(13).
383. Veeranki S, Winchester LJ, Tyagi SC. Hyperhomocysteinemia associated skeletal muscle weakness involves mitochondrial dysfunction and epigenetic modifications. *Biochim Biophys Acta.* 2015;1852(5):732-41.
384. Padmanabhan N, Jia D, Geary-Joo C, Wu X, Ferguson-Smith AC, Fung E, et al. Mutation in folate metabolism causes epigenetic instability and transgenerational effects on development. *Cell.* 2013;155(1):81-93.
385. Hannibal L, DiBello PM, Yu M, Miller A, Wang S, Willard B, et al. The MMACHC proteome: hallmarks of functional cobalamin deficiency in humans. *Mol Genet Metab.* 2011;103(3):226-39.
386. Caterino M, Pastore A, Strozzi MG, Di Giovamberardino G, Imperlini E, Scolamiero E, et al. The proteome of cblC defect: in vivo elucidation of altered cellular pathways in humans. *J Inher Metab Dis.* 2015;38(5):969-79.
387. Jakubowski H. Protein homocysteinylation: possible mechanism underlying pathological consequences of elevated homocysteine levels. *FASEB J.* 1999;13(15):2277-83.
388. Jakubowski H. Homocysteine thiolactone: metabolic origin and protein homocysteinylation in humans. *J Nutr.* 2000;130(2S Suppl):377S-81S.
389. Jakubowski H, Boers GH, Strauss KA. Mutations in cystathionine beta-synthase or methylenetetrahydrofolate reductase gene increase N-homocysteinylation protein levels in humans. *FASEB J.* 2008;22(12):4071-6.
390. Sharma GS, Kumar T, Singh LR. N-homocysteinylation induces different structural and functional consequences on acidic and basic proteins. *PLoS One.* 2014;9(12):e116386.

391. Sharma GS, Kumar T, Dar TA, Singh LR. Protein N-homocysteinylation: From cellular toxicity to neurodegeneration. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1850(11):2239-45.
392. Balint B, Federspiel JM, Schwab T, Ehrlich T, Ramsthaler F, Schafers HJ. Aortic Regurgitation Is Associated With Ascending Aortic Remodeling in the Nondilated Aorta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2021;41(3):1179-90.
393. Head PE, Myung S, Chen Y, Schneller JL, Wang C, Duncan N, et al. Aberrant methylmalonylation underlies methylmalonic acidemia and is attenuated by an engineered sirtuin. *Sci Transl Med*. 2022;14(646):eabn4772.
394. Polletta L, Vernucci E, Carnevale I, Arcangeli T, Rotili D, Palmerio S, et al. SIRT5 regulation of ammonia-induced autophagy and mitophagy. *Autophagy*. 2015;11(2):253-70.
395. Green R, Allen LH, Bjorke-Monsen AL, Brito A, Gueant JL, Miller JW, et al. Vitamin B(12) deficiency. *Nat Rev Dis Primers*. 2017;3:17040.
396. Godfrey KM, Barker DJ. Fetal nutrition and adult disease. *Am J Clin Nutr*. 2000;71(5 Suppl):1344S-52S.
397. Maruvada P, Stover PJ, Mason JB, Bailey RL, Davis CD, Field MS, et al. Knowledge gaps in understanding the metabolic and clinical effects of excess folates/folic acid: a summary, and perspectives, from an NIH workshop. *Am J Clin Nutr*. 2020;112(5):1390-403.
398. Stewart CP, Christian P, Schulze KJ, Arguello M, LeClerq SC, Khattry SK, et al. Low maternal vitamin B-12 status is associated with offspring insulin resistance regardless of antenatal micronutrient supplementation in rural Nepal. *J Nutr*. 2011;141(10):1912-7.
399. Yajnik CS, Deshpande SS, Jackson AA, Refsum H, Rao S, Fisher DJ, et al. Vitamin B12 and folate concentrations during pregnancy and insulin resistance in the offspring: the Pune Maternal Nutrition Study. *Diabetologia*. 2008;51(1):29-38.
400. Li Z, Gueant-Rodriguez RM, Quilliot D, Sirveaux MA, Meyre D, Gueant JL, et al. Folate and vitamin B12 status is associated with insulin resistance and metabolic syndrome in morbid obesity. *Clin Nutr*. 2018;37(5):1700-6.
401. Rush EC, Katre P, Yajnik CS. Vitamin B12: one carbon metabolism, fetal growth and programming for chronic disease. *Eur J Clin Nutr*. 2014;68(1):2-7.
402. Gueant-Rodriguez RM, Rendeli C, Namour B, Venuti L, Romano A, Anello G, et al. Transcobalamin and methionine synthase reductase mutated polymorphisms aggravate the risk of neural tube defects in humans. *Neurosci Lett*. 2003;344(3):189-92.
403. Afman LA, Lievers KJ, van der Put NM, Trijbels FJ, Blom HJ. Single nucleotide polymorphisms in the transcobalamin gene: relationship with transcobalamin concentrations and risk for neural tube defects. *Eur J Hum Genet*. 2002;10(7):433-8.
404. Gueant JL, Gueant-Rodriguez RM, Anello G, Bosco P, Brunaud L, Romano C, et al. Genetic determinants of folate and vitamin B12 metabolism: a common pathway in neural tube defect and Down syndrome? *Clin Chem Lab Med*. 2003;41(11):1473-7.
405. Candito M, Rivet R, Herbeth B, Boisson C, Rudigoz RC, Luton D, et al. Nutritional and genetic determinants of vitamin B and homocysteine metabolisms in neural tube defects: a multicenter case-control study. *Am J Med Genet A*. 2008;146A(9):1128-33.
406. Fofou-Caillierez MB, Gueant-Rodriguez RM, Alberto JM, Chery C, Josse T, Gerard P, et al. Vitamin B-12 and liver activity and expression of methionine synthase are decreased in fetuses with neural tube defects. *Am J Clin Nutr*. 2019;109(3):674-83.
407. Zhao JY, Qiao B, Duan WY, Gong XH, Peng QQ, Jiang SS, et al. Genetic variants reducing MTR gene expression increase the risk of congenital heart disease in Han Chinese populations. *Eur Heart J*. 2014;35(11):733-42.
408. Hassan FM, Khatlab AA, Abo El Fotoh WMM, Zidan RS. A66G and C524T polymorphisms of methionine synthase reductase gene are linked to the development of acyanotic congenital heart diseases in Egyptian children. *Gene*. 2017;629:59-63.

409. Deng C, Deng Y, Xie L, Yu L, Liu L, Liu H, et al. Genetic polymorphisms in MTR are associated with non-syndromic congenital heart disease from a family-based case-control study in the Chinese population. *Sci Rep.* 2019;9(1):5065.
410. De Bie I, Nizard SD, Mitchell GA. Fetal dilated cardiomyopathy: an unsuspected presentation of methylmalonic aciduria and hyperhomocystinuria, cblC type. *Prenat Diagn.* 2009;29(3):266-70.
411. Watson JD, Crick FH. The structure of DNA. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1953;18:123-31.
412. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1986;51 Pt 1:263-73.
413. Roth SC. What is genomic medicine? *J Med Libr Assoc.* 2019;107(3):442-8.
414. Fleischmann RD, Adams MD, White O, Clayton RA, Kirkness EF, Kerlavage AR, et al. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science.* 1995;269(5223):496-512.
415. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature.* 2001;409(6822):860-921.
416. Wilson BJ, Nicholls SG. The Human Genome Project, and recent advances in personalized genomics. *Risk Manag Healthc Policy.* 2015;8:9-20.
417. Roden DM, Tyndale RF. Genomic medicine, precision medicine, personalized medicine: what's in a name? *Clin Pharmacol Ther.* 2013;94(2):169-72.
418. Velculescu VE, Zhang L, Vogelstein B, Kinzler KW. Serial analysis of gene expression. *Science.* 1995;270(5235):484-7.
419. Parkinson J, Blaxter M. Expressed sequence tags: an overview. *Methods Mol Biol.* 2009;533:1-12.
420. Lowe R, Shirley N, Bleackley M, Dolan S, Shafee T. Transcriptomics technologies. *PLoS Comput Biol.* 2017;13(5):e1005457.
421. Shi J, Wu Y, Cai M, Shang S. Rapid diagnosis of herpetic encephalitis in children by PCR-microarray technology for simultaneous detection of seven human herpes viruses. *Eur J Pediatr.* 2010;169(4):421-5.
422. Chu Y, Corey DR. RNA sequencing: platform selection, experimental design, and data interpretation. *Nucleic Acid Ther.* 2012;22(4):271-4.
423. Rio DC, Ares M, Jr., Hannon GJ, Nilsen TW. Preparation of cytoplasmic and nuclear RNA from tissue culture cells. *Cold Spring Harb Protoc.* 2010;2010(6):pdb prot5441.
424. James P. Protein identification in the post-genome era: the rapid rise of proteomics. *Q Rev Biophys.* 1997;30(4):279-331.
425. Hortin GL, Jortani SA, Ritchie JC, Jr., Valdes R, Jr., Chan DW. Proteomics: a new diagnostic frontier. *Clin Chem.* 2006;52(7):1218-22.
426. Aslam B, Basit M, Nisar MA, Khurshid M, Rasool MH. Proteomics: Technologies and Their Applications. *J Chromatogr Sci.* 2017;55(2):182-96.
427. Oliver SG, Winson MK, Kell DB, Baganz F. Systematic functional analysis of the yeast genome. *Trends Biotechnol.* 1998;16(9):373-8.
428. Clish CB. Metabolomics: an emerging but powerful tool for precision medicine. *Cold Spring Harb Mol Case Stud.* 2015;1(1):a000588.
429. Tebani A, Afonso C, Marret S, Bekri S. Omics-Based Strategies in Precision Medicine: Toward a Paradigm Shift in Inborn Errors of Metabolism Investigations. *Int J Mol Sci.* 2016;17(9).
430. Tebani A, Abily-Donval L, Afonso C, Marret S, Bekri S. Clinical Metabolomics: The New Metabolic Window for Inborn Errors of Metabolism Investigations in the Post-Genomic Era. *Int J Mol Sci.* 2016;17(7).

431. Forny P, Bonilla X, Lamparter D, Shao W, Plessl T, Frei C, et al. 2022.
432. Horster F, Tuncel AT, Gleich F, Plessl T, Froese SD, Garbade SF, et al. Delineating the clinical spectrum of isolated methylmalonic acidurias: cblA and mut. *J Inherit Metab Dis.* 2021;44(1):193-214.
433. Matmat K, Gueant-Rodriguez RM, Oussalah A, Wiedemann-Fode A, Dionisi-Vici C, Coelho D, et al. Ocular manifestations in patients with inborn errors of intracellular cobalamin metabolism: a systematic review. *Hum Genet.* 2022;141(7):1239-51.
434. Wiedemann A, Oussalah A, Lamireau N, Theron M, Julien M, Mergnac JP, et al. Clinical, phenotypic and genetic landscape of case reports with genetically proven inherited disorders of vitamin B(12) metabolism: A meta-analysis. *Cell Rep Med.* 2022;3(7):100670.
435. Kim D, Langmead B, Salzberg SL. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. *Nat Methods.* 2015;12(4):357-60.
436. Pertea M, Pertea GM, Antonescu CM, Chang TC, Mendell JT, Salzberg SL. StringTie enables improved reconstruction of a transcriptome from RNA-seq reads. *Nat Biotechnol.* 2015;33(3):290-5.
437. Robinson MD, Oshlack A. A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. *Genome Biol.* 2010;11(3):R25.
438. Law CW, Chen Y, Shi W, Smyth GK. voom: Precision weights unlock linear model analysis tools for RNA-seq read counts. *Genome Biol.* 2014;15(2):R29.
439. Ge SX, Jung D, Yao R. ShinyGO: a graphical gene-set enrichment tool for animals and plants. *Bioinformatics.* 2020;36(8):2628-9.
440. Haberle J, Burlina A, Chakrapani A, Dixon M, Karall D, Lindner M, et al. Suggested guidelines for the diagnosis and management of urea cycle disorders: First revision. *J Inherit Metab Dis.* 2019;42(6):1192-230.
441. Lund AM, Skovby F, Vestergaard H, Christensen M, Christensen E. Clinical and biochemical monitoring of patients with fatty acid oxidation disorders. *J Inherit Metab Dis.* 2010;33(5):495-500.
442. Applegarth DA, Toone JR. Nonketotic hyperglycinemia (glycine encephalopathy): laboratory diagnosis. *Mol Genet Metab.* 2001;74(1-2):139-46.
443. Cleary MA, Dorland L, de Koning TJ, Poll-The BT, Duran M, Mandell R, et al. Ornithine aminotransferase deficiency: diagnostic difficulties in neonatal presentation. *J Inherit Metab Dis.* 2005;28(5):673-9.
444. Coutelier M, Goizet C, Durr A, Habarou F, Morais S, Dionne-Laporte A, et al. Alteration of ornithine metabolism leads to dominant and recessive hereditary spastic paraplegia. *Brain.* 2015;138(Pt 8):2191-205.
445. Clarke C, Xiao R, Place E, Zhang Z, Sondheimer N, Bennett M, et al. Mitochondrial respiratory chain disease discrimination by retrospective cohort analysis of blood metabolites. *Mol Genet Metab.* 2013;110(1-2):145-52.
446. Sim KG, Carpenter K, Hammond J, Christodoulou J, Wilcken B. Acylcarnitine profiles in fibroblasts from patients with respiratory chain defects can resemble those from patients with mitochondrial fatty acid beta-oxidation disorders. *Metabolism.* 2002;51(3):366-71.
447. Goedhart J, Luijsterburg MS. VolcanoR is a web app for creating, exploring, labeling and sharing volcano plots. *Sci Rep.* 2020;10(1):20560.
448. Shen BW, Hennig M, Hohenester E, Jansonius JN, Schirmer T. Crystal structure of human recombinant ornithine aminotransferase. *J Mol Biol.* 1998;277(1):81-102.
449. Ji Z, Liu GH, Qu J. Mitochondrial sirtuins, metabolism, and aging. *J Genet Genomics.* 2022;49(4):287-98.
450. Xiao ZP, Lv T, Hou PP, Manaenko A, Liu Y, Jin Y, et al. Sirtuin 5-Mediated Lysine Desuccinylation Protects Mitochondrial Metabolism Following Subarachnoid Hemorrhage in Mice. *Stroke.* 2021;52(12):4043-53.

451. Lucienne M, Mathis D, Perkins N, Fingerhut R, Baumgartner MR, Froese DS. Decrease of disease-related metabolites upon fasting in a hemizygous knock-in mouse model (Mut-ko/ki) of methylmalonic aciduria. *JIMD Rep.* 2021;58(1):44-51.
452. Schagger H, Brandt U, Gencic S, von Jagow G. Ubiquinol-cytochrome-c reductase from human and bovine mitochondria. *Methods Enzymol.* 1995;260:82-96.
453. Forny P, Bonilla X, Lamparter D, Shao W, Plessl T, Frei C, et al. Integrated multi-omics reveals anaplerotic rewiring in methylmalonyl-CoA mutase deficiency. *Nat Metab.* 2023;5(1):80-95.
454. Longo N, Sass JO, Jurecka A, Vockley J. Biomarkers for drug development in propionic and methylmalonic acidemias. *J Inherit Metab Dis.* 2022;45(2):132-43.
455. Stanescu S, Belanger-Quintana A, Fernandez-Felix BM, Ruiz-Sala P, Del Valle M, Garcia F, et al. Interorgan amino acid interchange in propionic acidemia: the missing key to understanding its physiopathology. *Amino Acids.* 2022;54(5):777-86.
456. Dapas M, Kandpal M, Bi Y, Davuluri RV. Comparative evaluation of isoform-level gene expression estimation algorithms for RNA-seq and exon-array platforms. *Brief Bioinform.* 2017;18(2):260-9.

Résumé : Le métabolisme de la vitamine B₁₂ est un processus complexe aboutissant à la synthèse des deux formes actives : l'adénosylcobalamine, cofacteur de la méthylmalonyl-CoA mutase, et la méthylcobalamine, cofacteur de la méthionine synthase, indispensable aux réactions de méthylation de l'organisme. Les erreurs innées du métabolisme de la vitamine B₁₂ sont des pathologies rares consécutives à un déficit d'une protéine ou d'une enzyme sur le transport, l'internalisation ou l'utilisation intracellulaire de la vitamine B₁₂. Les manifestations cliniques et métaboliques présentées par les patients offrent une grande diversité de présentation selon l'âge d'apparition des premiers symptômes et le gène muté. Nous avons réalisé une méta-analyse rassemblant l'ensemble des descriptions de 824 patients ayant un déficit génétiquement documenté du métabolisme de la vitamine B₁₂. Nous avons pu souligner l'apparition de manifestations neurologiques (trouble de la marche, atrophie cérébrale, neuropathie périphérique) avec l'âge, tout comme celle de manifestations cardiovasculaires (hypertension artérielle, thrombose). Ces profils neurologiques et cardio-vasculaires soulignent l'importance d'évoquer une erreur innée du métabolisme de la vitamine B₁₂, et la recherche génétique d'un tel déficit en cas de profil évocateur. La deuxième partie de ce travail a objectivé le rendement diagnostique d'un exome clinique comme test génétique de premier niveau au sein d'une population pédiatrique de 128 enfants consécutifs. 60% des CES étaient positifs en cas d'anomalie biochimique évocatrice, pour un délai médian de 5 mois, offrant un test diagnostique performant pour l'identification d'une IEM-B₁₂. La troisième partie de ce travail a mis en évidence dans des fibroblastes de patient une variation d'expression aux niveaux métabolomiques, transcriptomiques, protéomiques et post-traductionnelles (tel que l'ajout de propionaldéhyde) d'enzymes impliquées dans le métabolisme, notamment mitochondriale, sur des gènes et protéines associés à d'autres pathologies dont les manifestations cliniques permettent d'expliquer la variabilité clinique observée dans les IEM-B₁₂.

Mots clés : Vitamine B₁₂, Erreurs innées du métabolisme, Méta-analyse, Manifestations cliniques, Vieillesse, Modification post-transcriptionnelles, Sciences omiques.

Abstract: Vitamin B₁₂ metabolism is a complex process leading to the synthesis of two active forms: adenosylcobalamin, cofactor of methylmalonyl-CoA mutase, and methylcobalamin, cofactor of methionine synthase, which is essential for methylation reactions. Inborn errors of vitamin B₁₂ metabolism are rare pathologies resulting from a deficiency of a protein or an enzyme in the transport, internalization, or intracellular utilization of vitamin B₁₂. The clinical and metabolic manifestations presented by the patients offer a great diversity of presentations according to the age of onset of the first symptoms and the mutated gene. We performed a meta-analysis of 824 patients with a genetically documented deficiency of vitamin B₁₂ metabolism. We were able to highlight the appearance of neurological manifestations (gait disorder, cerebral atrophy, peripheral neuropathy) with age, as well as cardiovascular manifestations (blood hypertension, thrombosis). These neurological and cardiovascular profiles underline the importance of evoking an inborn error of vitamin B₁₂ metabolism, and the search for such a deficiency in case of a clinical evocative profile. The second part of this work aims to objectify the diagnostic yield of a clinical exome as a first level genetic test in a pediatric population of 128 consecutive children. 60% of CES were positive in case of suggestive biochemical abnormality, with a median delay of 5 months, offering a powerful diagnostic test for the identification of a IEM-B₁₂. The third part of this work highlighted in patient fibroblasts an expression variation at the metabolomic, transcriptomic, proteomic and post-translational modification levels (such as the addition of propionaldehyde) of enzymes involved in metabolism, notably mitochondrial, associated with other pathologies whose clinical manifestations may explain the clinical variability observed in IEM-B₁₂.

Keywords: Vitamin B₁₂, Inborn errors of metabolism, Meta-analyze, Clinical manifestations, Aging, Post-transcriptional modification, Multiomics analysis.