Université de Paris

Ecole doctorale N°563 Médicament, Toxicologie, Chimie, Imagerie

Saint-Pères Paris Institute for the Neurosciences (SPPIN)

Equipe 4 - Membrane Dynamics

Rôle synergique de deux transporteurs lysosomaux d'acides aminés dans le développement embryonnaire murin

Yann Terres

Directeur de thèse : Dr. Bruno Gasnier
Co-encadrante : Dr. Christine Anne-Longin

Thèse de doctorat de Biologie, médecine et santé

Membres du jury :			
	Marc Le Maire	PU émérite	Rapporteur
	Jérôme Ausseil	PU-PH	Rapporteur
	Corinne Antignac	PU-PH	Examinatrice
	Gian Carlo Bellenchi	Associate Pr.	Examinateur
	Renata Kozyraki	CR	Examinatrice
	Sylvie Schneider-Maunoury	DR	Examinatrice
	Bruno Gasnier	DR	Directeur

Table des matières

REMERCIEMENTS 9
CYSTINOSIS RESEARCH FOUNDATION 10
LISTE DES ABREVIATIONS 11
INTRODUCTION 13
PREAMBULE 13
A) BIOLOGIE DES LYSOSOMES ET TRANSPORTEURS LYSOSOMAUX 14
a) Le lysosome, un organite multifonctions 14
1) Structure des lysosomes et diversité de leurs composants 14
1.1) La membrane lysosomale 14
1.2) La lumière lysosomale 19
1.3) Structure lysosomale : bilan 20
2) Biogenèse et place des lysosomes dans la voie d'endocytose 21
2.1) Synthèse et acheminement des protéines lysosomales 21
2.2) Intrication entre biogenèse lysosomale et endocytose 23
2.3) Cycle de régénération des lysosomes 24
2.4) Contrôle de la reformation des lysosomes par les phosphoinositides 26
3) Régulation transcriptionnelle de la biogenèse lysosomale : rôle de TFEB 27
3.1) Le réseau CLEAR 27
3.2) Biogenèse lysosomale en réponse à une carence 28
3.3) Biogenèse lysosomale en réponse à une surcharge 29
b) Les grandes fonctions des lysosomes 29
1) La dégradation de macromolécules par les lysosomes 29
2) Les lysosomes sont les effecteurs de l'autophagie 30
2.1) Diversité et complexité des formes d'autophagie 30
2.2) Mécanismes de la macroautophagie 32
2.3) Mécanismes de la microautophagie 34
2.4) Les cibles de l'autophagie sélective : exemple des mitochondries 34
2.5) Adaptation cellulaire : transition de sélectivité 36
3) Le rôle des lysosomes dans la mort cellulaire 37
3.1) La voie intrinsèque d'apoptose, la mort cellulaire programmée 37
3.2) La mort cellulaire non contrôlée, ou nécrose 38

3.3) Adaptation de la réponse cellulaire aux différents degrés de perméabilisation de la membrane lysosomale 38
4) Les lysosomes comme plateformes de signalisation 39
4.1) Le chef d'orchestre de la croissance cellulaire mTORC1 est recruté et activé aux lysosomes 39
4.2) Rôle émergent de C9orf72 à la surface des lysosomes 42
c) Les transporteurs de la membrane des lysosomes 43
1) Les transporteurs lysosomaux : propriétés, rôles dans la signalisation cellulaire et pathologies associées 44
1.1) Transport d'une molécule à travers une membrane biologique : les différentes modalités de passage 44
1.2) Le gradient électrochimique comme force motrice : Na^+ ou H^+ ? 46
1.3) Les barrières à l'étude des transporteurs lysosomaux 47
1.4) Exemples de transporteurs lysosomaux connus 48
1.5) Exemple du transporteur lysosomal SNAT9, un senseur des niveaux d'acides aminés lysosomaux 49
1.6) Les maladies de surcharge lysosomale 54
2) La cystinosine, transporteur lysosomal de cystine 56
2.1) La cystinosine et la maladie génétique rare cystinose 56
2.2) Pharmacothérapie de la cystinose par la cystéamine 58
3) PQLC2, un transporteur lysosomal d'acides aminés cationiques 60
3.1) Découverte de PQLC2 et rôle dans l'action de la cystéamine 60
3.2) Propriétés mécanistiques de PQLC2 62
3.3) PQLC2 permet le recrutement du complexe C9orf72-SMCR8-WDR41 aux lysosomes . 65
B) ROLE DU SAC VITELLIN ET DE LA DEGRADATION LYSOSOMALE DANS LA NUTRITION PRECOCE DE L'EMBRYON DE MAMMIFERE 67
a) La neurulation et sa dépendance à la disponibilité en nutriments 68
1) Neurulation et formation du système nerveux 68
2) Les défauts de neurulation 71
3) Lien entre neurulation et nutrition 72
b) Différents modes de nutrition de l'embryon 74
1) Placenta et nutrition hémotrophique 74
2) L'autophagie dans le développement embryonnaire 75
c) La nutrition histiotrophique 76
1) Découverte de la nutrition histiotrophique 76
2) Mécanisme de la nutrition histiotrophique 79

2.1) Formation du sac vitellin, tissu effecteur de la nutrition histiotrophique 79
2.2) Internalisation de sécrétions maternelles dans le sac vitellin 79
2.3) Voie d'endocytose dans le sac vitellin : cas particulier des vacuoles apicales des cellules endodermales 81
3) Pertinence de la nutrition histiotrophique chez l'humain 83
d) Comparaison avec d'autres épithéliums absorptifs de protéines 87
1) Le tubule proximal rénal et le syndrome de Fanconi 87
1.1) Biologie des tubules contournés proximaux du rein 88
1.2) Le syndrome de Fanconi 90
2) Autres épithéliums 94
C) PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS DE LA THESE 96
a) Données antérieures du laboratoire 96
1) Création du modèle murin Pqlc2 KO 96
2) Découverte de la létalité synthétique du double KO de Pqlc2 et Ctns 97
b) Objectifs de la thèse 100
RESULTATS 103
A) Caractérisation de la létalité synthétique du double KO de *Ctns* et *Pqlc2* 103
a) Poursuite de la validation du KO de *Pqlc2* dans le modèle murin 103
b) Facteurs influençant la létalité synthétique induite par la perte de *Ctns* et *Pqlc2* 107
1) Expression de la létalité synthétique 107
2) Etude de cas : observation d'un rare survivant double KO 112
c) Caractérisation des défauts embryonnaires 118
1) Analyse au stade E12,5 120
2) Analyse au stade E10,5 et antérieur 127
3) Conclusions et limites de l'analyse morphologique des embryons 131
B) L'inactivation des gènes *Ctns* et *Pqlc2* impacte fortement le sac vitellin 134
a) Nouvelle hypothèse : les embryons DKO présentent-ils un défaut de nutrition histiotrophique ? 134
b) Altérations morphologiques du sac vitellin 135
1) Dilatation des compartiments lysosomaux 135
2) Autres défauts morphologiques 140
c) Altérations fonctionnelles du sac vitellin 143
1) Endocytose de matériel extracellulaire 143
2) Hydrolyse du matériel internalisé 145
d) Conclusions de l'étude du sac vitellin 150

C) Plusieurs approches mécanistiques 151
a) Approche réductionniste sur un modèle cellulaire 151
1) Modèle cellulaire HAP1 151
2) Altérations des compartiments lysosomaux chez les KO Pqlc2 et DKO 152
3) Régulation positive de protéines impliquées dans l'autophagie sélective chez le KO Pqlc2 155
3.1) Pourquoi un lien entre PQLC2 et l'autophagie sélective ? 155
3.2) Les protéines TAX1BP1, NDP52, NDFIP1 et p62 s'accumulent en l'absence de PQLC2157
3.3) Le complexe C9orf72 joue-t-il un rôle dans l'accumulation de ces protéines ? 165
3.4) Données préliminaires : lien avec mTOR et le cycle de régénération des lysosomes ?168
4) Conclusions de l'approche réductionniste sur cellules HAP1 171
b) L'activité de transport des deux protéines est-elle impliquée dans la létalité synthétique ? 172
1) Supplémentation des modèles murins par les substrats de PQLC2 173
2) Rôles possibles de l'arginine dans le phénotype de létalité synthétique 180
2.1) Rôle possible de Pqlc2 et Ctns dans la protection contre le stress oxydant 180
2.2) Possibilité d'une modulation indirecte de mTORC1 par le contrôle des niveaux intralysosomaux d'arginine par PQLC2 184
3) Correction des défauts du sac vitellin Ctns KO par la cystéamine 189
4) Développements méthodologiques pour un sauvetage génétique des cellules endodermales du sac vitellin viscéral 192
4.1) Création d'une lignée de souris transgénique exprimant la cystinosine uniquement dans le sac vitellin pendant le développement 192
4.2) Adaptation d'un protocole d'électroporation in utero pour la transfection des CESVV 193
D) Identification de défauts métaboliques associés à la létalité synthétique 195
a) Le liquide exocœlomique, une interface entre le sac vitellin et l'embryon 195
1) Le liquide exocœlomique 195
2) Approche utilisée pour la collecte de liquide exocœlomique 196
b) Résultats des analyses métabolomiques 197
1) Validation et aspects généraux des profils obtenus 197
2) Impact des simple KO sur les métabolites exocœlomiques 202
3) Le métabolome exocœlomique est fortement impacté chez les concepti DKO et chez les trialléliques Ctns -/- Pqlc2 +/- 204
3.1) Le génotype DKO induit des variations significatives de nombreux métabolites 204
3.2) Contraste entre les profils métabolomiques induits par les génotypes trialléliques .. 208

4) Recherche d'une signature spécifique des échantillons DKO 210
c) Conclusions et perspectives de l'analyse métabolomique 214
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES 217
A) Phénotype du sac vitellin : perspectives pour le traitement de la cystinose 218
a) Le sac vitellin viscéral : un modèle pertinent pour étudier le syndrome de Fanconi de la cystinose ? 218
b) Généralisation à d'autres maladies de stockage lysosomal ? 219
B) Identification de nouvelles propriétés biologiques de PQLC2 221
a) Un rôle de Pqlc2 dans la modulation de la microautophagie ? 221
1) Les leçons du l'approche réductionniste sur cellules HAP1 221
2) Les leçons de l'analyse morphologique du sac vitellin 222
3) Les leçons de l'analyse du métabolome exocœlomique 223
4) Une nouvelle fonction de Pqlc2 ? 225
b) Rôle signalétique de PQLC2 et du complexe C9orf72 ? 227
C) Bases moléculaires possibles de la convergence entre *Ctns* et *Pqlc2* 228
a) La létalité du DKO est-elle causée par une dérégulation métabolique ? 228
1) Le cycle de la méthionine et l'activité Wnt : un point de convergence possible entre les activités de la cystinosine et de PQLC2 ? 228
2) Hypothèse d'un empoisonnement à l'ammonium comme cause de létalité 231
b) Dérégulation possible de mTORC1 chez les DKO ? 233
c) Le sac vitellin est-il le seul lieu de l'interaction génétique entre *Ctns* et *Pqlc2* ? 234
Conclusion générale 236
MATERIEL ET METHODES 237
Modèles cellulaires 237
a) Lignées de cellules utilisées 237
b) Culture cellulaire 237
c) Carence nutritionnelle et traitements 238
Modèles murins 238
a) Lignées 238
b) Gestion des lignées 239
c) Supplémentation nutritionnelle de l'eau de boisson 240
d) Supplémentation nutritionnelle des granulés 240
e) Phénotypage 241
Génotypage des animaux 241
a) Ctns 241
b) Pqlc2 242

Prélèvement d'échantillons embryonnaires 243
a) Extraction d'embryons 243
b) Prélèvement de fluide exocœlomique 244
c) Prélèvement d'embryons ou de sacs vitellins 244
d) Maintien de sacs vitellins ex vivo et traitements aigus 245
Histologie et whole mount 245
a) Cryosections 245
b) Paraffine 246
c) H&E 246
d) Fluorescence au DAPI en whole mount 247
Immunofluorescence 247
a) IF sur tissus 247
b) IF sur cellules 248
c) Anticorps utilisés 248
Microscopie et traitement d'image 249
a) Microscopie à épifluorescence 249
b) Microscopie confocale 249
c) Quantification 250
d) Macroscopie à fluorescence 250
e) Microscopie en lumière blanche 250
f) Photographie en lumière blanche à la loupe binoculaire 251
Western Blot 251
a) Lyse des échantillons biologiques 251
b) Dosage des protéines totales par BiCinchoninic acid Assay (BCA) 252
c) SDS-PAGE 252
d) Western Blot 252
e) Anticorps utilisés 253
Analyse métabolomique des fluides exocœlomiques d'embryons E10,5 253
Transport d'arginine sur lysosomes partiellement purifiés 254
Protocole complémentaire détaillé de l'analyse métabolomique 256
a) Raw experimental data acquition 256
b) Data treatment 258
REFERENCES 264
ANNEXES 282

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier Bruno pour m'avoir offert l'opportunité de faire une thèse dans son laboratoire, et pour l'énergie qu'il a investi dans son rôle de mentor, qui m'a permis d'apprendre énormément.

Merci aussi à Christine, qui fût ma tutrice lors de mon arrivé au laboratoire en 2015 (durant mon master 2), et qui m'a toujours soutenu dans tous les domaines durant ma thèse.

Je remercie vivement Marc Le Maire, Jérôme Ausseil, Corinne Antignac, Gian Carlo Bellenchi, Renata Kozyraki et Sylvie Schneider-Maunoury pour avoir accepté de faire partie de mon jury et pour avoir évalué mon travail.

Merci également à l'ensemble des membres de l'équipe 4 du SPPIN, Cécile, Claire, Corinne, Damien, Elodie, Hynda, Isabelle, Océane, Rossella et Solène, ainsi que les anciens, Christopher, Damien, Dany, Mélanie, Seana et Xavier, avec qui j'ai eu le plaisir de travailler et d'échanger.

Je remercie également nos collaborateurs Phillipe Djian et Brigitte Delhomme de l'équipe 1 du SPPIN, Florence Castelli et François Fenaille du CEA Saclay, Christian Thiel de l'université de Heidelberg, Hong wa Yung et Graham Burton de l'université de Cambridge.

Merci à nos interlocuteurs sur la plateforme d'histologie de l'ICM (Histomics), la plateforme Cyto2BM et le service commun de microscopie du CUSP, ainsi que la plateforme d'imagerie du petit animal de l'Université Descartes (LIOPA). Un merci tout particulier à l'ensemble de l'équipe de la plateforme d'hébergement et d'élevage du CUSP, dont le travail et le professionnalisme ont été précieux pour la réalisation de cette thèse.

Je remercie vivement la Cystinosis Research Fundation pour avoir financé l'ensemble de mes travaux de thèse et de m'avoir fait confiance.

Enfin, merci à ma famille et à mes amis pour leur soutien durant ces quatre années.

CYSTINOSIS RESEARCH FOUNDATION

La Cystinosis Research Foundation (CRF) est une organisation à but non lucratif qui soutient la recherche scientifique et clinique sur la cystinose. C'est grâce à leur dévouement infaillible à cette cause depuis près de 20 ans que la perspective de guérir définitivement cette maladie se rapproche tous les jours un peu plus.

La CRF a financé mes quatre années de thèse, et je leur en suis immensément reconnaissant. J'espère humblement que mes travaux pourront contribuer à cet effort de longue date et à améliorer la qualité de vie des patients cystinotiques. Je souhaite à la CRF tous les succès possibles dans le futur.

LISTE DES ABREVIATIONS

AA : Acide aminé

C57BL/6 : Lignée murine C57 Black / 6

C9orf72 : chromosome 9 open reading frame 72

CAA : Acide aminé cationique

CESVV : Cellule endodermale du sac vitellin viscéral

CLEAR : Coordinated Lysosomal Expression and Regulation

CoA : Coenzyme A

Cq : Chloroquine

DAPI : Di Aminido Phenyl lndol

DKO : Double Knock-Out

dpc : days *post-coitum*

E10,5 / E12,5 : embryonic day 10,5 / 12,5

ESCRT : Endosomal Sorting Complexes Required For Transport

EV : Endoderme viscéral

GAP : GTPase-activating Protein

GEF : Guanine nucleotide Exchange Factor

GFP : Green fluorescent protein

GSH : Glutathion

GSNO : Nitrosoglutathion

H&E : Hématoxyline et éosine

IF : Immunofluorescence

ILV : Vésicule intraluminale

KD : Knock-Down

KI : Knock-In

KO : Knock-Out

LC-MS : Liquid chromatography - mass spectrometry

LSRR : modèle de Létalité Synthétique Récessive-Récessive

mIgG : Immunoglobuline murine

MLS : Maladies de Surcharge Lysosomale

MVB : Corps multivésiculaires

mTOR : mammalian/mechanistic Target Of Rapamycin

mTORC1 : mammalian/mechanistic Target Of Rapamycin Complex 1

MxD : Cysteine-cystéamine mixed disulfide

NTD : Neural tube Defects

PI(3,5)P2 : Phosphatidylinositol(3,5)bisphosphate

PI(4,5)P2 : Phosphatidylinositol(4,5)bisphosphate

PI3P : Phosphatidylinositol-3-phosphate

PQLC2 : PQ-loop containing protein 2

RFP : Red fluorescent protein

SAM : S-adénosyméthionine

Shh : Sonic hedgehog

SVV : Sac vitellin viscéral

TFEB : Transcription factor EB

Ttr : Transthyrétine

VE : Endoderme viscéral

WB : Western-blot

Wnt : Wingless Integrated

WT : Wild type

INTRODUCTION

PREAMBULE

Ce travail se focalise sur l'implication de deux transporteurs lysosomaux d'acides aminés dans le développement embryonnaire chez la souris :

- La cystinosine, transporteur de cystine dont la perte de fonction est à l'origine d'une maladie rare appelée cystinose.
- *PQLC2*, transporteur d'acides aminés cationiques dont l'activité est indispensable pour la pharmacothérapie de la cystinose par la cystéamine.

Cette implication dans le développement embryonnaire se manifeste par une létalité synthétique entre les disruptions génétiques des deux transporteurs.

J'introduirai brièvement dans un premier temps la biologie des lysosomes et leurs fonctions, avec une attention particulière portée sur les transporteurs de la membrane de cet organite et leur place dans l'homéostasie cellulaire.

Dans un second temps, je présenterai en détail le processus de nutrition dite 'histiotrophique' des embryons précoces de souris, qui est défectueux chez les animaux constitutivement dépourvus de nos transporteurs d'intérêt, ainsi que la pertinence de cette observation pour la compréhension de certains aspects cliniques de la cystinose.

Enfin, je présenterai succinctement les résultats antérieurs du laboratoire sur lesquels est bâtie la problématique de cette thèse.

A) BIOLOGIE DES LYSOSOMES ET TRANSPORTEURS LYSOSOMAUX

a) Le lysosome, un organite multifonctions

1) Structure des lysosomes et diversité de leurs composants

Les lysosomes sont des organites hydrolytiques acides mis en évidence pour la première fois en 1955 par Christian de Duve. Ils sont présents dans toutes les cellules animales (excepté les hématies) et varient fortement par leur nombre, leur taille (0,1 à 1 µm de diamètre) et leur contenu. On retrouve leur équivalent chez les plantes et les levures, appelées vacuoles. Leur particularité principale réside dans leur activité lytique facilitée par leur pH acide (pH 4,5 - 5) et leur important contenu enzymatique. En dehors des conditions de mort cellulaire, ce contenu lytique est séparé du cytoplasme par une bicouche lipidique qui contient différentes protéines régulant diverses fonctions de ces organites.

1.1) La membrane lysosomale

La membrane des lysosomes est une bicouche phospholipidique d'une épaisseur d'environ 10 nm qui contient un grand nombre de protéines transmembranaires. La plus distinctive de cet organite est sans doute l'ATPase pompe à protons vacuolaire (v-ATPase), responsable de son acidification (Rothman, Yamashiro, Raymond, Kane, & Stevens, 1989) et essentielle à sa fonction. Parmi les protéines transmembranaires les plus courantes de la membrane lysosomale (également utilisées comme marqueurs de ces compartiments), on compte les

Lysosomal Associated Membrane Proteins 1 (LAMP1) et 2 (LAMP2) et Lysosomal Integral Membrane Protein 2 (LIMP2) (Saftig & Klumperman, 2009b). Ces protéines jouent un rôle important dans la préservation de l'intégrité structurale des lysosomes : en effet, leurs domaines exposés à la lumière lysosomale sont fortement glycosylés, et l'abondance de ces protéines protège ainsi la membrane et les autres protéines membranaires contre les hydrolases du lysosome (Howe *et al.*, 1988). La connaissance que l'on a des divers rôles remplis par les LAMPs est aujourd'hui plus complète : ces protéines sont impliqués dans les évènements de fusion et la motilité des lysosomes, avec une implication de LAMP2 dans l'autophagie médiée par chaperons (Ruivo, Anne, Sagné, & Gasnier, 2009). Ces protéines (LAMP1/2 et LIMP) sont également impliquées dans l'export de cholestérol lysosomal d'origine exogène en parallèle à la protéine Niemann Pick type C1 (NPC1) (Heybrock et al., 2019; Jian Li & Pfeffer, 2016), l'exocytose, ou encore l'acheminement d'hydrolases telles que la β-glucocérébrosidase aux lysosomes (Eskelinen et al., 2002; Saftig & Klumperman, 2009a).

Les lysosomes possèdent également à leur surface des canaux ioniques (voir figure 1). Parmi eux, on peut citer les Two Pore Channel (TPC) 1 et 2 (Cang, Bekele, & Ren, 2014), des canaux calciques comme la mucolipine (TRPML1) et P2X4, et le canal potassique TMEM175 (Cang, Aranda, Seo, Gasnier, & Ren, 2015). Ces canaux jouent un rôle important puisqu'ils permettent de contrôler les niveaux intra-lysosomaux de différents ions (protons, sodium, potassium et calcium en particulier) dont les gradients de concentration transmembranaires et les perméabilités déterminent le potentiel électrique de la membrane lysosomale. Ce paramètre va à son tour influencer le comportement de plusieurs canaux et transporteurs lysosomaux, donc le niveau d'acidification de la lumière, les flux ioniques, et l'efflux de différents catabolites. L'activité de ces canaux est régulée, et elle intègre des signaux variés tels que les niveaux d'ATP, d'espèces oxygénées réactives, et certaines molécules de signalisation

(phosphatidyinositol(3,5)biphosphate – voir plus loin) (Xiong & Zhu, 2016). De plus, les TPCs et TRPML1 influencent et sont influencés par l'activité de la protéine mTOR, un régulateur central de nombreux processus cellulaires (P. Li, Gu, & Xu, 2018). Enfin, des dysfonctionnements de ces canaux sont impliqués dans des maladies neurodégénératives ; des mutations de TRPML1 sont la cause d'une maladie rare, la mucolipidose de type 4.

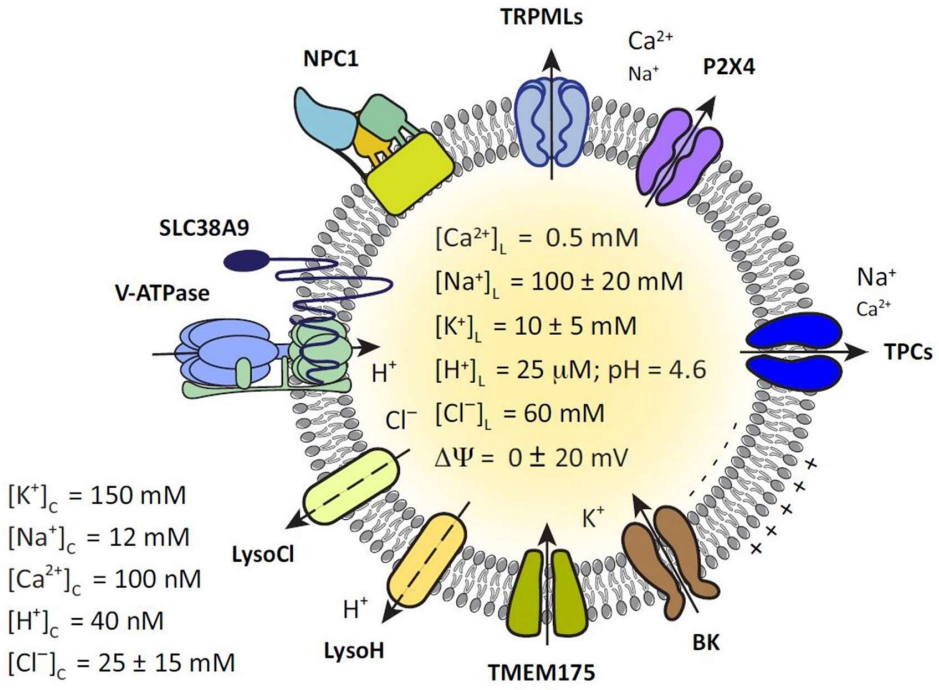


Figure 1 : Principales voies de passage des ions inorganiques à travers la membrane lysosomale. Concentrations luminales (estimées) et cytosoliques des différentes espèces ioniques et principaux canaux ioniques de la membrane lysosomale. Les canaux TRPMLs, P2X4, et TPCs permettent le passage du sodium et du calcium, et les canaux BK et TMEM175 permettent celui du potassium. La v-ATPase est responsable de l'acidification des lysosomes.
Adapté de Li, Gu, & Xu, Trends In Biochemical Sciences 2018

Les canaux calciques identifiés à la membrane lysosomale sont TRPML1 et P2X4 ; les TPCs ont aussi été rapportés comme transportant le calcium (Calcraft et al., 2009) mais cela reste controversé et d'autres groupes les considèrent comme spécifique du sodium (Morgan & Galione, 2014; X. Wang et al., 2012). Ils possèdent un rôle particulier dans la fonction du lyososome, puisque la libération du calcium lysosomal est impliquée dans de nombreux processus tels que la fusion des lysosomes avec les endosomes et autophagosomes, la

formation de sites de contact avec le réticulum endoplasmique, la biogenèse en réponse au stress oxydant et la fission lysosomale (Ballabio & Bonifacino, 2019; Saffi & Botelho, 2019).

On retrouve également à la membrane des lysosomes des protéines jouant un rôle dans leur motilité. En effet, ces organites ne sont pas statiques dans le cytoplasme, mais se meuvent le long des réseaux de microtubules grâce à des 'moteurs moléculaires' permettant les déplacements antérogrades (kinésine) et rétrogrades (dynéine). La direction générale de ces mouvements n'est pas aléatoire, elle répond aux conditions dans lesquelles se trouvent la cellule : par exemple, une carence nutritionnelle induit un regroupement des lysosomes dans la région périnucléaire, ceci afin de faciliter leur fusion avec les autophagosomes. La kinésine et la dynéine ont besoin, pour assurer le déplacement des lysosomes, d'interagir avec des protéines de leur surface. Une étude récente (Pu, Keren-Kaplan, & Bonifacino, 2017) a contribué à mieux identifier cette interaction pour la kinésine. Cette dernière interagit avec la petite GTPase Arl8b à la membrane lysosomale, laquelle est normalement recrutée par le complexe BLOC1-related (BORC). En conditions de carence en acides aminés, le complexe Rag-Ragulator (qui recrute le complexe mTORC1 aux lysosomes, détaillé plus loin) inhibe BORC, bloquant ainsi les mouvements antérogrades des lysosomes qui se regroupent donc au centre de la cellule afin de faciliter l'autophagie. La dynéine (et son adaptateur dynactine) quant à elle interagit avec la GTPase Rab7 (et son effecteur RILP) à la membrane des compartiments endolysosomaux (Johansson et al., 2007). On notera par ailleurs que d'autres protéines Rab sont impliquées dans la motilité d'autres compartiments subcellulaires (Lamber, Siedenburg, & Barr, 2019) ; par exemple, les endosomes précoces expriment Rab5 à leur membrane. Ainsi la motilité de divers organites est influencée par les activités de facteurs d'échange nucléotidique de guanine (Guanine nucleotide Exchange Factors, GEF) et de protéines activatrices de GTPases (GTPase-Activating Proteins, GAP), qui agissent en accélérant la

vitesse de passage de l'état inactif (lié au GDP) à l'état actif (lié au GTP) et inversement en facilitant l'hydrolyse du GRP, mais dont les identités moléculaires restent encore largement méconnues.

Les lysosomes ne sont pas des organites statiques, ils interagissent aussi avec d'autres compartiments cellulaires. On distingue deux catégories d'interactions : (1) la fusion, avec les endosomes ou avec d'autres lysosomes dans la voie d'endocytose d'une part, et avec la membrane plasmique pour l'exocytose lysosomale d'autre part ; (2) la formation de points de contact membranaires avec d'autres organites, par exemple le réticulum endoplasmique (transfert de lipides), le Golgi (regroupement périnucléaire des lysosomes) et les mitochondries (mitophagie et réponse au stress oxydant). Au niveau moléculaire, ces processus ont lieu comme suit :

- Les évènements de fusion sont médiés par des protéines de la famille des SNAREs (soluble N-ethyl-maleimide-sensitive fusion attachment protein receptor) parmi lesquelles on peut citer les syntaxines (STX) et les vesicle-associated membrane protein (VAMP) par exemple. De manière intéressante, le complexe BORC nécessaire à la motilité des lysosomes est aussi impliqué dans les phénomènes de fusion. L'efflux de calcium lysosomal joue un rôle clé dans le contrôle de ces processus.
- Les points de contact avec les membranes des autres organites font intervenir différentes protéines. On mentionnera par exemple l'interaction STARD3/VPS13C-VAP pour les sites de contact entre lysosomes et réticulum endoplasmique et le transfert de cholestérol, ou encore l'interaction Rab34-RILP pour les contacts avec l'appareil de Golgi facilitant le regroupement périnucléaire des lysosomes.

1.2) La lumière lysosomale

La lumière des lysosomes contient environ une soixantaine d'hydrolases (nucléases, protéases, glycosidases, lipases) dont l'action collective dégrade de nombreux types de macromolécules. Parmi ces enzymes, la famille des protéases de type cathepsine est la mieux décrite. On retrouve les cathepsines B, C, D et L de manière ubiquitaires dans les lysosomes, et elles jouent également un rôle important dans les processus de mort cellulaire (voir plus loin). Beaucoup ces enzymes fonctionnent de manière optimale à pH acide. Comme mentionné précédemment, la v-ATPase accumule activement des protons à l'intérieur des lysosomes, ce qui maintient le pH de la lumière à une valeur de 4,5. D'autres espèces ioniques jouent un rôle clé, en particulier les concentrations de sodium et de potassium, dont les rapports sont inversés par rapport au cytoplasme. Les perméabilités de ces ions à travers les différents canaux ioniques permettent, avec les protons et le chlore, d'établir le potentiel électrique de membrane des lysosomes.

Enfin, en raison de leur activité catabolique intense, les lysosomes produisent en quantité importante des nutriments issus de la dégradation de macromolécules, par exemple lors de l'autophagie. Ces nutriments, pour pouvoir être utilisés par la cellule, doivent quitter la lumière des lysosomes et être exportés dans le cytoplasme. Cela est permis par la présence d'un grand nombre de transporteurs dédiés dans la membrane lysosomale (Chapel et al., 2013). Tout comme les hydrolases de la lumière, ces transporteurs sont activés par le pH acide de la lumière lysosomale. En effet, ils sont souvent couplés aux protons (symporteurs de protons), utilisant ainsi le gradient de pH transmembranaire comme force motrice pour exporter activement les catabolites lysosomaux. Plus de détails sur les transporteurs lysosomaux seront exposés ultérieurement.

1.3) Structure lysosomale : bilan

Comme résumé sur la figure 2, les lysosomes sont donc des organites mobiles interagissant avec d'autres compartiments subcellulaires, avec pour particularité de posséder un contenu acide et hautement dégradatif assurant le recyclage des composants élémentaires des macromolécules intra- ou extra-cellulaires. Ils constituent donc une réserve de divers types de nutriments : acides aminés, lipides, sucres, nucléosides et ions inorganiques. L'utilisation de ces molécules par le métabolisme cellulaire requiert l'activité de divers canaux et transporteurs de la membrane lysosomale. Enfin, et comme nous l'aborderons dans la partie (b), les lysosomes constituent aussi des plateformes importantes pour la signalisation cellulaire.

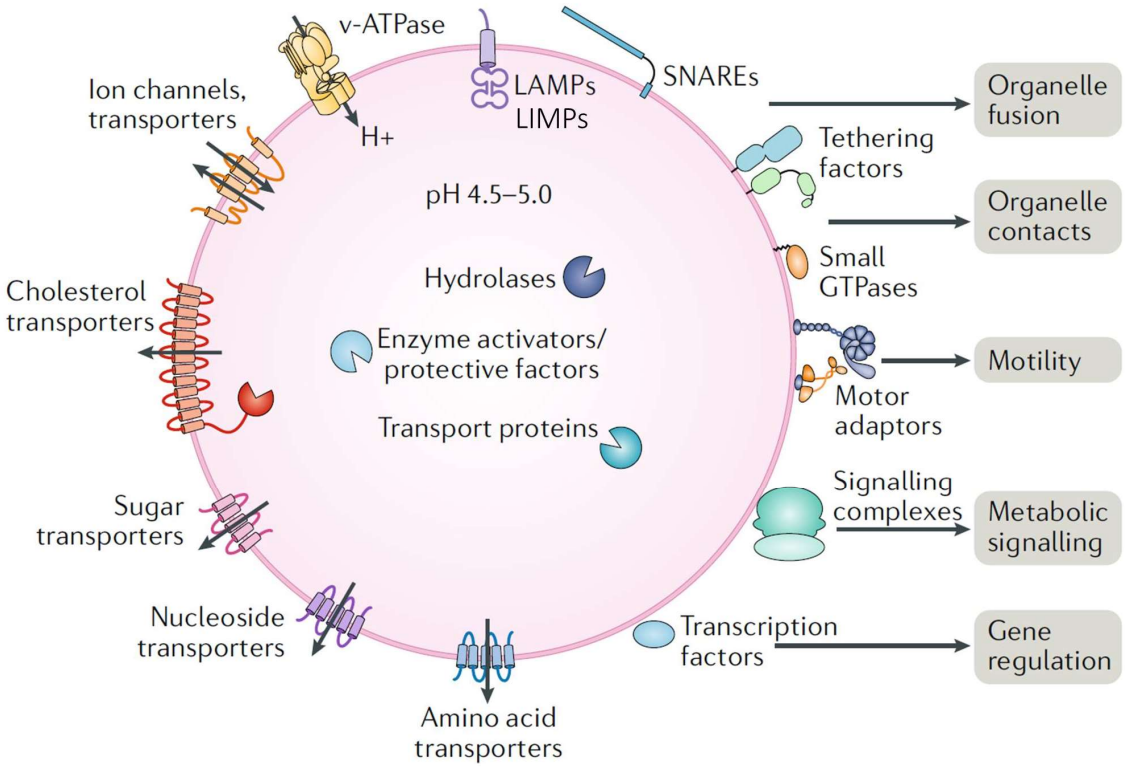


Figure 2 : Diversité des protéines lysosomales. Les propriétés fonctionnelles et dynamiques des lysosomes leur sont conférées en partie par leur protéines membranaires qui jouent des rôles de ménage tels que l'export de catabolites produits par la digestion enzymatique, mais sont aussi impliquées dans diverses fonctions comme la mobilité des lysosomes, leur capacité à interagir avec d'autres organites ou à servir de plateforme de signalisation.
Adapté de Ballabio & Bonifacino, Nature Reviews 2019

2) Biogenèse et place des lysosomes dans la voie d'endocytose

Le maintien et l'adaptation de la population de lysosomes aux besoins dégradatifs de la cellule fait intervenir à la fois la biogenèse des lysosomes (formation *de novo*) et le recyclage de leurs composants solubles et membranaires à la fin des processus d'endocytose, de phagocytose ou d'autophagie.

2.1) Synthèse et acheminement des protéines lysosomales

La voie la mieux décrite pour acheminer les hydrolases lysosomales nouvellement synthétisées aux lysosomes est celle des récepteurs au mannose-6-phosphate (M6P). Les enzymes sont synthétisées dans le réticulum endoplasmique, puis subissent une modification post-traductionnelle dans l'appareil de Golgi consistant en l'ajout de M6P sur des résidus glycosylés. Les récepteurs au M6P sont des protéines de la membrane du Golgi qui se lient aux hydrolases ainsi marquées, les séquestrent dans des vésicules couvertes de clathrines et les transportent depuis le réseau trans-Golgi jusqu'aux compartiments endocytaires où elles sont acheminées.

Il est utile de préciser que les récepteurs au M6P sont présents dans le trans-Golgi, sur les endosomes précoces et tardifs, et même à la membrane plasmique, mais sont en revanche absents des lysosomes (Ghosh, Dahms, & Kornfeld, 2003). La raison admise pour cela est que l'envoi des récepteurs au M6P directement aux lysosomes entrainerait leur dégradation. D'ailleurs, et bien que ce soit débattu, l'absence de récepteur au M6P permettrait de différencier les compartiments endosomaux des compartiments lysosomaux. Ces récepteurs

au M6P sont en fait recyclés dans des vésicules au niveau des endosomes tardifs où le pH acide permet leur dissociation des protéines lysosomales auxquelles ils étaient liés, puis ces vésicules retournent au réseau trans-Golgi.

Certaines routes alternatives d'acheminement existent comme celles de la sortiline, un récepteur chargé de l'acheminement de la prosaposine (PSAP), ou encore celle acheminant la β-glucocérébrosidase via le récepteur LIMP2 comme mentionné dans la première partie de cette introduction.

L'acheminement des protéines de la membrane lysosomale fait intervenir des mécanismes différents de celui des hydrolases luminales. Ces protéines comportent dans leur séquence un ou plusieurs motif(s) de ciblage lysosomal, par exemple un motif de type di-leucine (DXXLL ou [DE]XXXL[LI]) ou un motif de type tyrosine (YXXΦ, avec Φ=AA hydrophobe). Ces motifs, désignés par leurs résidus critiques, sont reconnus par les protéines adaptatrices GGA et AP1, respectivement. Ces protéines permettent l'interaction avec le manteau de clathrines au niveau du réseau trans-Golgi. En sortie de ce réseau, les vésicules emportant les protéines membranaires lysosomales sont soit directement acheminées au système endocytaire, soit acheminées à la membrane plasmique dans un premier temps, puis endocytées dans un second temps. Une fois internalisées, ces protéines membranaires vont suivre la maturation progressive des endosomes pour aboutir dans les compartiments terminaux, les (endo)lysosomes. Par exemple, au niveau de structures particulières apparentées aux endosomes précoces appelées 'réseaux de tri tubulaire', l'adaptateur AP3 oriente les protéines de la membrane lysosomale vers les lysosomes.

2.2) Intrication entre biogenèse lysosomale et endocytose

L'acheminement des protéines résidentes du lysosome lors de la biogenèse emprunte en parallèle la voie d'acheminement du matériel à dégrader (dans le cas d'une endocytose).

L'endocytose est le processus par lequel la cellule internalise des molécules externes dans des compartiments appelés endosomes précoces. Ces derniers constituent en premier lieu une plateforme de tri :

- Certaines protéines, notamment les récepteurs de la membrane plasmique, sont renvoyés à la membrane plasmique via des endosomes dits 'de recyclage'. Cela nécessite l'action d'un complexe appelé WASH qui ségrége ces protéines et permet l'interaction avec un réseau d'actine branché servant de support mécanique à la tubulation et à la fission des endosomes. Il en résulte la formation des endosomes de recyclage (Simonetti & Cullen, 2019).
- Le reste du contenu des endosomes est destiné à être dégradé. A celui-ci viennent s'ajouter d'autres protéines. La machinerie ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport) ainsi recrutée est responsable de l'internalisation de protéines membranaires ubiquitinylées (voir partie sur l'autophagie sélective) dans des vésicules intraluminales des endosomes, formant des compartiments appelés endosomes multivésiculaires (multivesicular bodies, MVB, en anglais) (Saftig & Klumperman, 2009b).

Il est intéressant de constater une relation complexe entre le ciblage des protéines lysosomales et la maturation des endosomes. Par exemple, l'acheminement de la v-ATPase aux endosomes permet de les acidifier, ce qui constitue l'un des marqueurs de la maturation

de ces compartiments. Cette acidification permet aussi la conversion des précurseurs inactifs d'enzymes lysosomales en enzymes fonctionnelles. Ce processus est dynamique, et se produit de manière progressive : la frontière entre endosomes précoces, endosomes tardifs et lysosomes est donc en réalité assez floue, bien qu'elle facilite la représentation conceptuelle de la voie d'endocytose. Ainsi, on comprend mieux pourquoi la biogenèse lysosomale ne fait pas intervenir uniquement la néosynthèse protéique, mais implique aussi des voies de recyclage nécessitant des machineries de trafic intracellulaire complexes et encore largement méconnues (voir partie suivante).

2.3) Cycle de régénération des lysosomes

Les lysosomes fusionnent avec des endosomes, des autophagosomes et des phagosomes pour former des organites hybrides : respectivement des endolysosomes, autophagolysosomes et phagolysosomes. Les enzymes lysosomales dégradent ainsi leur contenu à pH acide. Cependant, les composants lysosomaux (hydrolases, protéines membranaires, etc.) utilisés dans ce processus ne sont pas perdus pour la cellule. En effet ces organites hybrides vont entamer un processus de fission duquel il résulte la formation de nouveaux lysosomes (Saffi & Botelho, 2019).

Ceci permet notamment à la cellule une économie énergétique en évitant la synthèse *de novo* des protéines lysosomales. Ainsi, les lysosomes sont régénérés dans un cycle de fusion et de fission, permettant une mobilisation rapide de leurs capacités déprédatives, tout en préservant les hydrolases (voir figure 3, exemple donné pour les endosomes).

Selon le groupe de Paul Luzio, les lysosomes ainsi issus des phénomènes de fission constitueraient une population particulière appelée lysosomes terminaux, avec pour particularité de contenir des enzymes lytiques mais de ne pas avoir un pH acide. Leurs hydrolases seraient donc inactives, jusqu'à ce que se produise la fusion avec des endosomes tardifs acides (Bright, Davis, & Luzio, 2016) (figure 3).

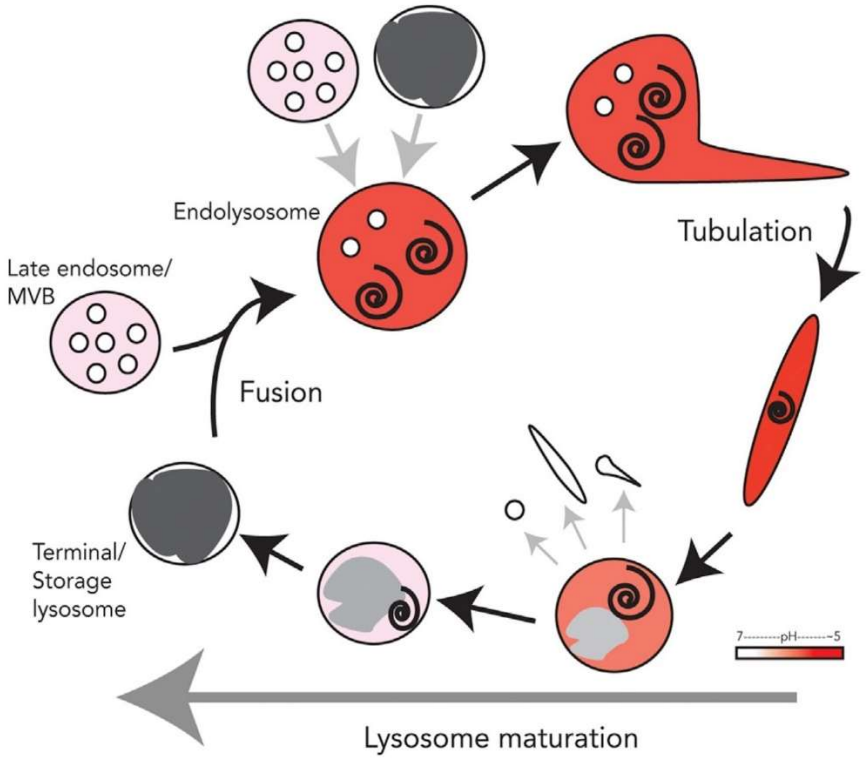


Figure 3 : Cycle de régénération des lysosomes. La dégradation du matériel biologique s'effectue dans les endolysosomes à pH acide en présence d'hydrolases acides actives ; différentes protéines membranaires et enzymes sont ensuite ségrégées dans des tubules pour reformer des lysosomes terminaux (ou lysosomes de stockage), non acides, qui servent de réserves d'hydrolases et sont susceptibles de fusionner avec des endosomes tardifs. Des cycles de régénération des lysosomes similaires existent pour l'autophagie et la phagocytose.
Adapté de Bright, Davis & Luzio, Current Biology 2016

Bien que les mécanismes mis en jeu dans la fission soient insuffisamment caractérisés à ce jour, on sait cependant que ce phénomène peut se produire de deux façons (Saffi & Botelho, 2019), qui ne sont pas mutuellement exclusives : (1) par bourgeonnement : dans ce cas la membrane de l'endolysosome en cours de fission sera partiellement recouverte d'un manteau protéique (clathrines notamment) pour former une nouvelle vésicule ; (2) par tubulation :

dans ce cas, le bourgeon va s'étendre jusqu'à former un tubule intermédiaire, qui subira ensuite une scission. Ce dernier phénomène dépend de l'interaction avec les microtubules (Swanson, Bushnell, & Silverstein, 2006). La vésicule ou le tubule ainsi formé emporte sélectivement des composants lysosomaux pour reformer un lysosome terminal. A noter, un cas particulier de fusion partielle, appelé 'kiss and run' dans laquelle un lysosome et un endosome tardif fusionnent leurs membranes de manière très localisée et transitoire, permettant un échange de matériel luminal tout en évitant une coalescence complète de leurs lumières (Bright et al., 2005).

Il est à noter que ce phénomène de fission décrit pour les endolysosomes est aussi valable pour les autophagolysosomes, bien que les mécanismes soient différents. Ce processus de reformation des lysosomes à partir des autophagolysosomes (Autophagic Lysosome Reformation, ALR) ne sera pas détaillé ici.

2.4) Contrôle de la reformation des lysosomes par les phosphoinositides

Les acteurs moléculaires régulant la fission des lysosomes ne sont pas encore tous connus. On sait cependant que la GTPase lysosomale Arl8b, qui sert de point d'ancrage aux kinésines et assure la mobilité des lysosomes vers la périphérie de la cellule (Pu et al., 2017), est aussi impliquée dans la tubulation des lysosomes (Mrakovic, Kay, Furuya, Brumell, & Botelho, 2012). La perte d'Arl8b dans le sac vitellin d'embryons murins induit la formation de vacuoles lysosomales élargies dans les cellules de l'épithélium endodermal (Oka et al., 2017). Cette dilatation pourrait s'expliquer par un blocage du cycle des lysosomes à l'étape de fission. Globalement, la fission lysosomale est régulée par des phosphoinositides. Une régulation positive est induite par le phosphatidylinositol-3-phosphate (PtdIns(3)P) (Munson et al.,

2015), le phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate ($PI(4,5)P_2$) (Rong et al., 2012), la kinase PIKfyve et son produit, le phosphatidylinositol-3,5-bisphosphate ($PI(3,5)P_2$) (Jin *et al.,* 2016 ; Bissig *et al.,* 2017). A l'inverse, la kinase PIK4IIIβ et son produit, le phosphatidylinositol-4-phosphate (PtdIns(4)P) inhibent la fission (Sridhar et al., 2013).

Parmi ces signaux, le $PI(3,5)P_2$ joue vraisemblablement un rôle prépondérant par rapport aux autres phosphoinositides, en raison de sa localisation préférentielle aux lysosomes (Choy, Han, & Botelho, 2017). L'inhibition pharmacologique de PIKfyve induit l'élargissement des endolysosomes (Krishna et al., 2016), en accord avec le rôle indispensable du $PI(3,5)P_2$ dans la reformation des lysosomes. Bien qu'on ne connaisse pas toutes ses cibles, il est établi que ce phosphoinositide active le canal calcique lysosomal TRPML1. Le calcium ainsi libéré participerait à la fission en stimulant l'activité de la dynamine-1 qui exerce un effet de remodelage de la membrane lysosomale (Cao, Yang, Zhong, & Dong, 2017), de manière dépendante du pH (Saffi & Botelho, 2019). Comme TRPML1 est nécessaire à l'activation de mTORC1 (R.-J. Li et al., 2016; W. Wang et al., 2015), il est possible que ce soit en fait cette voie de signalisation qui régule la fission lysosomale (Y. Yang et al., 2019).

3) Régulation transcriptionnelle de la biogenèse lysosomale : rôle de TFEB

3.1) Le réseau CLEAR

En raison de toutes les fonctions biologiques assurées par les lysosomes, leur nombre est finement régulé pour répondre aux besoins de la cellule (comme c'est également le cas pour les mitochondries par exemple, voir plus loin). Ce contrôle est dépendant de l'activité d'un facteur de transcription appelé Transcription Factor EB (TFEB), qui active la transcription des

gènes responsables de la biogenèse lysosomale (Sardiello et al., 2009), mais aussi d'autres fonctions impliquant les lysosomes telles que l'autophagie, l'endocytose et l'exocytose (Palmieri et al., 2011), ce qui représente au total plusieurs centaines de gènes. Les régions promotrices de ces gènes contiennent un motif de liaison à TFEB appelé CLEAR (pour Coordinated Lysosomal Expression and Regulation), on parle alors de "réseau CLEAR" pour désigner les cibles transcriptionnelles de TFEB.

TFEB n'est pas le seul facteur de transcription capable de contrôler la biogenèse lysosomale. Il appartient à une famille de facteurs de transcription appelée MiT-TFE, et d'autres membres de cette famille, MTIF, TFE3 et TFEC, régulent l'expression des gènes lysosomaux ou des phénomènes associés.

3.2) Biogenèse lysosomale en réponse à une carence

L'activité de TFEB est réprimée ou stimulée selon les conditions internes et externes de la cellule. Un signal bien connu capable d'activer TFEB est la carence nutritionnelle. Lorsque les niveaux d'acides aminés sont suffisants, le complexe mTORC1 est recruté et activé à la surface des lysosomes. mTORC1 phosphoryle TFEB, ce qui a pour effet d'inhiber ce dernier en le maintenant dans le cytoplasme (Y. Chen, Gucek, Puertollano, & Martina, 2012; Settembre et al., 2012), voir partie dédiée à mTOR. En revanche, lors d'une carence en acides aminés, mTORC1 se dissocie des lysosomes et s'inactive. L'inhibition de TFEB est alors levée, ce qui permet sa translocation au noyau et la transcription des gènes du réseau CLEAR. La biogenèse lysosomale et l'autophagie seront stimulées et la cellule pourra donc produire les nutriments qui lui font défaut, en digérant une partie de ses composants. Cette réponse transcriptionnelle adapte donc la dégradation lysosomale aux besoins de la cellule.

3.3) Biogenèse lysosomale en réponse à une surcharge

Lors d'un 'stress' lysosomal causé par une surcharge de la lumière de cet organite, par exemple lorsque la quantité de matériel biologique à recycler dépasse les capacités dégradatives des lysosomes (Verdon et al., 2017), la cellule forme alors des lysosomes *de novo* pour ajuster ses capacités lytiques. D'autres protéines clés de la cellule, telles que MAPK1 (Settembre et al., 2011), ou Akt (Palmieri et al., 2017), sont aussi capables de phosphoryler TFEB et ainsi exercer une influence sur l'activité autophagique.

b) Les grandes fonctions des lysosomes

De nombreux travaux menés ces vingt dernières années ont permis de mieux comprendre les nombreux rôles joués par ces organites hautement dynamiques. La conception ancienne du lysosome comme simple éboueur de la cellule a été remplacée au fur et à mesure par celle d'un centre métabolique et de signalisation essentiel à l'homéostasie cellulaire.

1) La dégradation de macromolécules par les lysosomes

Comme mentionné précédemment, le rôle premier des lysosomes est la dégradation de macromolécules en catabolites utilisables par la cellule. Ces macromolécules peuvent provenir de différentes sources : l'endocytose, la phagocytose et l'autophagie (voir partie suivante). La phagocytose concerne des cellules spécialisées du système immunitaire comme

les macrophages, et consiste en l'internalisation d'un pathogène ou d'un corps apoptotique suivie de sa dégradation dans les lysosomes. Dans le cas de la destruction d'un pathogène, ce mécanisme est indispensable à l'acheminement et à la présentation de motifs antigéniques à d'autres cellules de l'immunité pour induire une réponse immunitaire adaptative, plus spécifique et plus durable.

La voie d'endocytose est utilisée par la cellule pour l'acquisition de nutriments externes. C'est par exemple le cas du fer associé (sous forme Fe^{3+}) à la transferrine. Lorsque cette dernière se lie à son récepteur, l'ensemble est endocyté et la libération du fer se fait ensuite dans les endolysosomes (Hemmaplardh & Morgan, 1977). C'est également le cas d'autres molécules diverses telles que le cholestérol (Murakami et al., 1990) ou la cobalamine (Youngdahl-Turner, Mellman, Allen, & Rosenberg, 1979). La voie d'endocytose joue aussi un rôle dans le renouvellement des composants de la membrane plasmique, ou encore dans la régulation de sa composition dans des réponses adaptatives (par exemple, diminution de l'expression d'un récepteur à la surface de la cellule).

2) Les lysosomes sont les effecteurs de l'autophagie

2.1) Diversité et complexité des formes d'autophagie

L'autophagie est un processus d'autodigestion par lequel la cellule séquestre et dégrade une partie de ses composants, tels que des protéines, des organites ou des agrégats protéiques. Ce mécanisme fut d'abord décrit comme une réponse à une carence nutritionnelle, la dégradation du matériel cellulaire non essentiel permettant alors de produire les nutriments manquants et d'alimenter le métabolisme : on parle dans ce cas d'autophagie induite. Mais il

existe en permanence dans la cellule un certain niveau d'autophagie basale, dont le rôle est d'effectuer la clairance de protéines anormales ou d'organites vieillissants qui peuvent être dangereux pour la cellule. L'autophagie est d'ailleurs la seule voie d'élimination des organites âgés ou défectueux.

On distingue trois mécanismes d'autophagie différents (figure 4) :

1. La macroautophagie, la voie la plus largement étudiée, consiste en l'internalisation de protéines et d'organites dans des vésicules à double membrane appelées autophagosomes, qui fusionnent ensuite avec des lysosomes et forment des autophagolysosomes où la dégradation aura lieu.
2. La microautophagie consiste en une invagination de la membrane des endolysosomes puis à l'internalisation et à la digestion des composants cytoplasmiques séquestrés dans les vésicules internes.
3. L'autophagie médiée par les chaperons n'implique pas la séquestration du matériel à dégrader. Ses cibles sont des protéines spécifiques porteuses d'un motif KFERQ reconnu par la protéine Heat Shock Cognate 70 kDa (HSC70). L'acheminement aux lysosomes et la translocation de la protéine à dégrader dépendent de l'interaction de HSC70 avec LAMP2-A (une isoforme de LAMP2) (Bandyopadhyay, Kaushik, Varticovski, & Cuervo, 2008). Cette forme d'autophagie ne sera pas décrite ici.

Notons que la macroautophagie peut être non-sélective (bulk autophagy en anglais) ou au contraire sélective de cibles particulières : par exemple la mitophagie (recyclage des mitochondries), l'agréphagie (dégradation d'agrégats protéiques ubiquitinylés), la pexophagie (recyclage des péroxysomes), etc.

En bref, on pourrait dire que décrire un phénomène autophagique revient à le classifier selon trois paramètres : son déclencheur (autophagie basale ou induite), le mécanisme par lequel il s'exécute (macroautophagie, microautophagie ou autophagie médiée par chaperons) et ses cibles (autophagie sélective ou non sélective ; si sélective, quelles cibles).

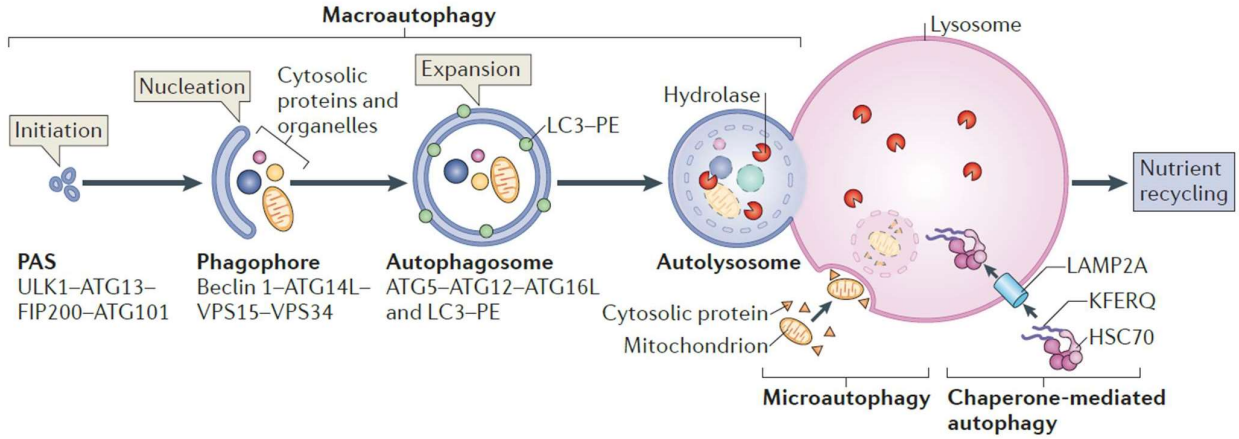


Figure 4 : Les trois mécanismes d'autophagie. L'autophagie peut être réalisée dans la cellule selon trois mécanismes différents : la macroautophagie, scénario dans lequel le matériel à dégradé est séquestré dans un compartiment appelé autophagosome qui fusionne ensuite avec les lysosomes ; la microautophagie qui consiste en une invagination de la membrane des lysosomes puis à l'internalisation du matériel à dégrader ; l'autophagie médiée par chaperons, qui permet l'acheminement aux lysosomes de protéines porteuses d'un motif KFERQ.
Adapté de Kaur & Debnath, Nature Reviews 2015

2.2) Mécanismes de la macroautophagie

La macroautophagie débute avec la formation d'un site d'assemblage du phagophore au niveau du matériel à séquestrer, ce qui fait intervenir les complexes UNC51-like kinase (ULK) (composé des protéines ULK1/2, FIP200 et ATG13/101) et PI3K (composé des protéines VPS15/34, Beclin1 et ATG14). Le phagophore recrute ensuite ATG5/12/16 et débute son élongation, marquée par la conjugaison de phosphatidyléthanolamine à la protéine LC3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3). Cette dernière joue un rôle critique à la fois pour l'expansion du phagophore, pour la reconnaissance des 'cargos' autophagiques et pour la fusion des autophagolysosomes avec les lysosomes. Par ailleurs, cette lipidation de LC3

(conversion de LC3a en LC3b), détectable en électrophorèse de protéines, est un marqueur d'activation de l'autophagie couramment employé. L'autophagosome ainsi formé fusionne ensuite avec un (endo)lysosome pour former un autophagolysosome. Le matériel biologique séquestré est alors dégradé au contact des hydrolases lysosomales et du pH acide.

La dynamique des autophagosomes est étroitement liée aux réarrangements du cytosquelette :

1. Le complexe Arp2/3 favorise la formation d'un réseau branché d'actine qui sert à la fois de cadre structurant pour la formation du phagophore au niveau du réticulum endoplasmique, mais permet aussi l'acheminement de matières premières pour l'expansion du phagophore, c'est à dire des phospholipides et certaines protéines adaptatrice de l'autophagie (Atg9). Ce transport sur l'actine branchée est réalisé par un moteur moléculaire particulier, la myosine VI.
2. D'autre part, la fusion de l'autophagosome avec l'(endo)lysosome nécessite que ces compartiments se déplacent pour se rapprocher. Ce déplacement a lieu le long des réseaux de microtubules et est médié par les moteurs moléculaires dynéine et kinésine (Kast & Dominguez, 2017). Les lysosomes vont alors amorcer un mouvement centripète qui va les rapprocher des autophagosomes.

La principale voie de régulation de la macroautophagie est la voie mTORC1, qui sera décrite en détail dans la partie dédiée. En bref, le complexe mTORC1 intègre différents signaux sur la disponibilité en nutriments essentiels (glucose, acides aminés) ainsi qu'en facteurs de croissance. Leur présence recrute et active le complexe à la surface des lysosomes, un processus qui à son tour favorise la croissance cellulaire et inhibe les processus cataboliques tels que l'autophagie.

2.3) Mécanismes de la microautophagie

La microautophagie est un processus moins bien connu que la macroautophagie, qui permet la dégradation de mitochondries, de portions de noyau et de cytoplasme (Farré, Krick, Subramani, & Thumm, 2009). Elle peut être sélective ou non sélective (Mijaljica, Prescott, & Devenish, 2011). Mécanistiquement, la microautophagie consiste en une invagination, voire une protrusion, de la membrane limitante de l'endosome tardif vers l'intérieur de l'organite pour former un tubule puis une vésicule intraluminale (ILV) qui internalise les macromolécules ou organites à digérer (Oku & Sakai, 2018). Il n'y a donc pas de formation d'autophagosome, mais plutôt une formation directe de vésicules à l'intérieur de la lumière lysosomale. L'invagination de la membrane lysosomale dépend de l'activité de la GTPase Vps1p (Kuravi et al., 2006; W. W. Li, Li, & Bao, 2012) mais son rôle précis n'est pas encore compris. Ces vésicules sont ensuite dégradées par des lipases permettant la libération de leur contenu. Ces lipases ne sont pas toutes connues, mais on peut citer Atg15p (soit Aut5/Cvt17p) (Epple, Suriapranata, Eskelinen, & Thumm, 2001). Les mécanismes régulant la microautophagie ne sont pas bien connus, le complexe ESCRT y joue cependant un rôle prépondérant au moment de l'invagination (Oku & Sakai, 2018).

2.4) Les cibles de l'autophagie sélective : exemple des mitochondries

Dans le cas d'une carence nutritionnelle, la macroautophagie induite est majoritairement non sélective : des portions de cytoplasme sont séquestrées et digérées par la cellule pour obtenir les nutriments manquants. Les autophagies sélectives fonctionnent différemment : leur but n'est pas de produire des nutriments, mais plutôt d'éliminer des composants dangereux ou inutiles. Par exemple, des mitochondries âgées dont la production d'espèces oxygénées est

anormalement élevée (mitophagie), des lysosomes dont la membrane est endommagée (lysophagie), des agrégats de protéines (agréphagie), ou encore des pathogènes (xénophagie)… Les protéines ou organites à dégrader sont porteurs d'un motif de reconnaissance sous la forme d'une modification post-traductionnelle, qui est le plus souvent une ubiquitinylation, mais peut aussi être une phosphorylation ou une argininylation par exemple. Les protéines ainsi étiquetées sont reconnues par des récepteurs d'autophagie sélective. Puis ces récepteurs s'associent au phagophore, plus précisément à LC3, grâce à un domaine appelé LC3-interacting region (LIR). On peut citer parmi ces récepteurs les protéines p62/SQSTM1 (Sequestosome-1) (Bjørkøy et al., 2005; Pankiv et al., 2007), CALCOCO2/NDP52 (von Muhlinen, Thurston, Ryzhako, Bloor, & Randow, 2010), OPTN (optineurin) (P. Wild et al., 2011), ou encore TAX1BP1 (Whang et al., 2017).

L'exemple d'autophagie sélective le mieux décrit est la mitophagie, c'est-à-dire la dégradation sélective des mitochondries par macroautophagie. Le contrôle qualité des mitochondries, y compris la mitophagie, sont des processus finement régulés par la cellule, qui font intervenir la voie de mitophagie médiée par PINK1-Parkin. La protéine transmembranaire PTEN-Induced Putative Kinase 1 (PINK1) est normalement transloquée dans la membrane interne de la mitochondrie où elle est lysée. Mais lorsque la mitochondrie est dysfonctionnelle (stress, âge…), elle ne parvient pas à maintenir un pH acide dans son compartiment intermembranaire. PINK1 n'est alors pas clivée et elle s'accumule à la surface de la mitochondrie, où elle s'auto-phosphoryle et recrute l'ubiquitine ligase Parkine. Différentes protéines à la surface de la mitochondrie sont alors poly-ubiquitinylées par la Parkine puis phosphorylées par PINK1. L'accumulation de ce signal induit le recrutement de p62 et de la machinerie autophagique (Palikaras, Lionaki, & Tavernarakis, 2018). La mitochondrie est alors dégradée.

On notera enfin que la mitophagie joue aussi un rôle clé dans certaines régulations physiologiques, par exemple lors de la maturation des érythrocytes où les mitochondries sont complètement éliminées (dans ce cas, la mitophagie est induite, et non basale).

2.5) Adaptation cellulaire : transition de sélectivité

Comme on vient de le voir, les autophagies sélectives dégradent divers organites dont les mitochondries. Cependant, ces dernières ne doivent pas être dégradés en trop grand nombre, car elles jouent un rôle vital pour la cellule. Comment cela est-il évité ? Autrement dit, existent-ils des "garde-fous" des autophagies sélectives ? Une étude récente (Mejlvang et al., 2018) a mis en évidence l'existence d'un mécanisme de transition de sélectivité de la microautophagie : en cas de carence en acides aminés, la cellule active la macroautophagie non sélective pour favoriser la production de nutriments, tout en inhibant les autophagies sélectives (la mitophagie par exemple) pour conserver des organites précieux pour la cellule.

Dans cette étude, les auteurs observent, dans les premières heures d'un stress nutritionnel, la dégradation de différentes protéines impliquées dans des autophagies sélectives : des ubiquitines ligases, des récepteurs de différentes autophagies sélectives et des protéines adaptatrices. Ce phénomène se produit de manière indépendante de l'activité de mTORC1, et sa mise en place est plus rapide que la réponse induite par mTOR. La dégradation de ces protéines impliquées dans des autophagies sélectives se produit dans les lysosomes, et non dans le protéasome. De plus, elle fait intervenir un mécanisme similaire à de la microautophagie, médiée par ESCRT-III.

3) Le rôle des lysosomes dans la mort cellulaire

Les lysosomes, par l'intermédiaire de l'autophagie, jouent un rôle favorable à la survie cellulaire. Premièrement, l'autophagie apporte des nutriments issus des réserves de la cellule lors d'une carence nutritionnelle. D'autre part, en conditions basales, elle assure la clairance des organites âgés et dysfonctionnels, de protéines mal conformées et d'agrégats protéiques pouvant être délétères pour la cellule. Mais les lysosomes sont aussi impliqués dans la mort cellulaire programmée, ou apoptose, dans les cellules de mammifères. Ainsi, les hydrolases lysosomales peuvent à la fois jouer le rôle d'effecteurs dans la mort cellulaire programmée, ou bien être les initiateurs d'une catastrophe cellulaire conduisant à la nécrose. A ce titre, les lysosomes constituent depuis longtemps une cible intéressante pour explorer de nouvelles thérapies anticancéreuses.

3.1) La voie intrinsèque d'apoptose, la mort cellulaire programmée

La voie intrinsèque d'apoptose est déclenchée par des signaux propres à la cellule, comme par exemple le suppresseur de tumeur p53. Elle fait intervenir la libération des cathepsines B et D grâce à la perméabilisation contrôlée de la membrane lysosomale par deux protéines de la famille B-Cell CLL/Lymphoma 2 (Bcl-2), Bax et Bak. L'action contrôlée des cathepsines lysosomales va à son tour perméabiliser la membrane mitochondriale, induire la libération de cytochrome c, la formation de l'apoptosome et l'activation de la voie des caspases (Aits & Jaattela, 2013; Mrschtik & Ryan, 2015). Le noyau se condense et le cytosquelette subit des réarrangements très importants conduisant *in fine* à la fragmentation de la cellule en corps apoptotique.

3.2) La mort cellulaire non contrôlée, ou nécrose

Dans le cas anormal où la perméabilisation de la membrane lysosomale est très importante, une libération anarchique du contenu des lysosomes dans le cytosol, notamment des hydrolases autres que les cathepsines, provoque des dégâts massifs et irréversibles dans la cellule. Le résultat pour la cellule est la mort cellulaire non contrôlée, ou nécrose (Repnik, Hafner Cesen, & Turk, 2014). Ces hydrolases étant normalement actives à pH acide, il n'est pas encore clair aujourd'hui si le maintien de leur activité résulte d'une acidification partielle du cytosol et/ou d'un maintien prolongé de leur conformation active.

3.3) Adaptation de la réponse cellulaire aux différents degrés de perméabilisation de la membrane lysosomale

Les espèces oxygénées réactives sont particulièrement dangereuses pour les lysosomes car ces derniers ne possèdent pas de système de défense anti-oxydant propre (chimique ou enzymatique) et doivent compter sur l'efficacité des systèmes cytoplasmiques. Si ces derniers sont défaillants, des dégâts plus ou moins importants peuvent alors se produire sur la membrane des lysosomes. De même, une dilatation lysosomale causée par des agents pharmacologiques lysosomotropiques (l'ammonium par exemple) ou par une surcharge contribue à fragiliser cette membrane. Dans le cas où la perméabilisation de la membrane est légère, le complexe ESCRT va intervenir pour la réparer (Skowyra, Schlesinger, Naismith, & Hanson, 2018). Cependant, si les dégâts sont plus poussés, la cellule met en place à la fois la lysophagie, c'est-à-dire la dégradation ciblée de lysosomes défaillants, mais aussi la biogenèse lysosomale pour tenter de rétablir une fonction lysosomale normale.

4) Les lysosomes comme plateformes de signalisation

4.1) Le chef d'orchestre de la croissance cellulaire mTORC1 est recruté et activé aux lysosomes

Longtemps réduits à leur rôle de compartiments dégradatifs, la communauté scientifique a pris conscience au cours de ces dernières années que les lysosomes jouaient aussi un rôle critique dans la signalisation cellulaire, plus particulièrement dans la voie mTORC1. La protéine mTOR (mammalian/mechanistic target of rapamycin) est une sérine/thréonine kinase jouant un rôle central dans le contrôle de nombreux processus cellulaires. Elle forme deux complexes : mTORC1 et 2 (figure 5 A). Le premier, mTORC1, est composé de mTOR, Raptor et mLST8. Par l'intermédiaire de deux effecteurs clé, p70S6 et 4EBP, il stimule la synthèse protéique, lipidique, et nucléotidique, et il favorise la croissance cellulaire. Dans le complexe mTORC2, la protéine Raptor est remplacée par Rictor ; mTORC2 joue un rôle complémentaire puisqu'il favorise la survie et la prolifération cellulaire via la phosphorylation d'Akt. mTOR coordonne donc des processus anaboliques qui nécessitent que la cellule mobilise des ressources importantes. Ainsi, les complexes mTORC1 et 2 intègrent un certain nombre de signaux internes et externes leur permettant de 'sentir' la disponibilité de ces ressources, mais aussi certaines conditions favorables ou défavorables à la croissance cellulaire (figure 5 B). Parmi ces signaux, on retrouve les facteurs de croissance, les dommages liés au stress oxydant, l'énergie sous la forme du glucose, mais aussi les briques élémentaires indispensables à la synthèse protéique : les acides aminés.

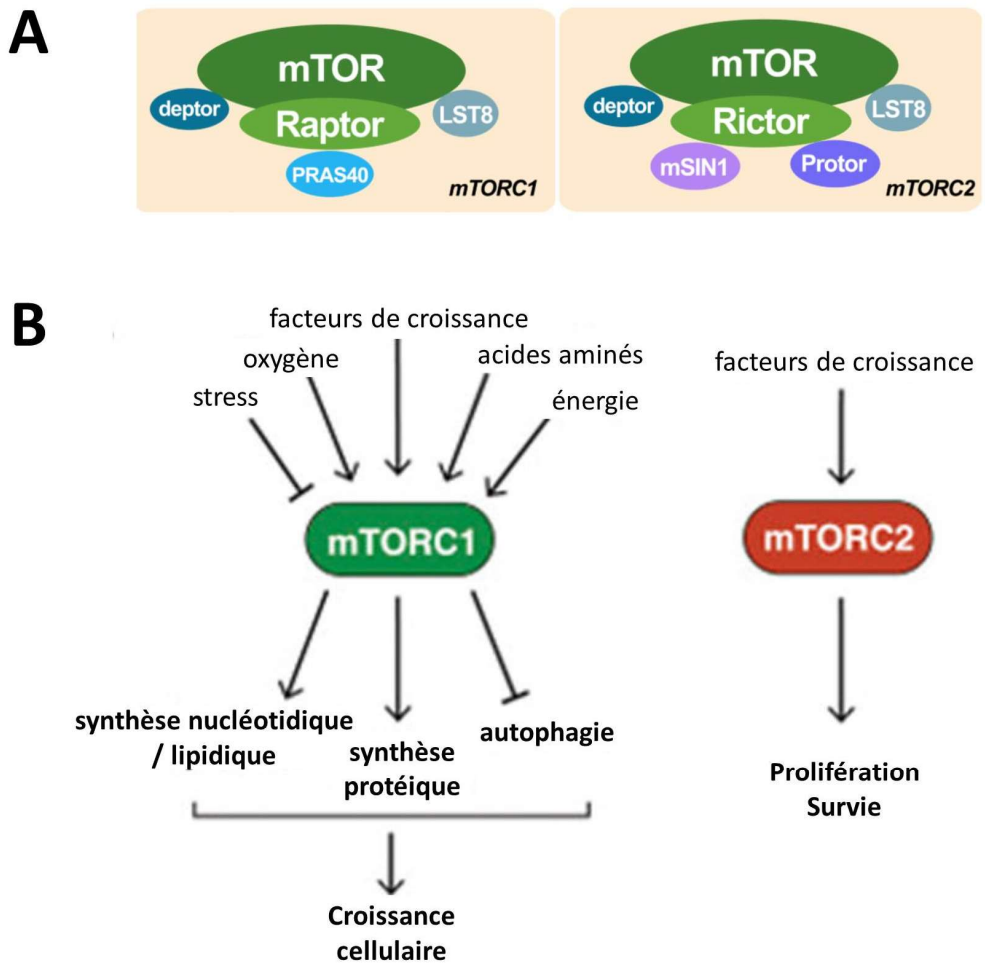


Figure 5 : mechanistic Target of Rapamycin et anabolisme. **(A)** mTOR s'associe avec différentes protéines pour former les complexes mTORC1 et mTORC2. **(B)** Ces complexes intègrent différents signaux et contrôlent divers processus cellulaires. *Adapté de Zoncu, Efeyan, & Sabatini, Nat Rev Mol Cell Biol 2011*

Lorsque les niveaux d'acides aminés sont suffisants, mTORC1 est recruté au lysosome par le complexe Rag-Ragulator, constitué d'une part par les GTPases RagA/B et RagC/D, et d'autre part par les protéines adaptatrices LAMTOR 1 à 5. A la surface des lysosomes, la protéine Rheb activée par des facteurs de croissance active à son tour mTORC1. Le lysosome est donc un site clé pour l'intégration des multiples signaux détectés par mTORC1. Le complexe mTORC1 activé phosphoryle aussi la protéine ULK1, et inhibe ainsi l'autophagie en empêchant la formation du phagophore. mTORC1 phosphoryle également le facteur de transcription TFEB, ce qui

empêche sa translocation au noyau et inhibe la biogenèse lysosomale. L'activité de mTORC1 est donc finement régulée en fonction des besoins nutritionnels de la cellule.

mTORC1 intègre les signaux de deux types de senseurs d'acides aminés, en particulier les niveaux d'arginine, de méthionine et de leucine qui sont les acides aminés capables d'activer le plus fortement le complexe.

Le premier système informe mTORC1 sur les niveaux *cytosoliques* d'acides aminés. Il est constitué de différents senseurs (CASTOR, SAMTOR et SESTRIN) et des complexes GATOR1/2 qui intègrent leurs signaux (figure 6). GATOR fonctionne en inhibant constitutivement le recrutement de mTORC1. Quand les acides aminés sont présents dans le cytosol, l'arginine, la méthionine et la leucine se lient respectivement à CASTOR, SAMTOR et SESTRIN, qui vont à leur tour inhiber GATOR, ce qui lève l'inhibition du recrutement lysosomal de mTOR. Ainsi, un niveau suffisant de ces acides aminés dans le cytosol active des voies de signalisation contrôlées par mTORC1.

Le second senseur du niveau d'acides aminés a été découvert plus récemment. Il s'agit de la protéine SNAT9 (également désignée par le nom de son gène *SLC38A9*), qui est un transporteur lysosomal d'acides aminés essentiels régulé de manière allostérique par l'arginine intralysosomale. SNAT9 est un transcepteur, c'est-à-dire une protéine transmembranaire capable d'agir à la fois comme un transporteur, mais aussi comme récepteur transduisant des signaux dans la cellule. Il joue le rôle de senseur du niveau *intralysosomal* d'acides aminés (Jung, Genau, & Behrends, 2015; Rebsamen et al., 2015; S. Wang et al., 2015) (figure 6). Etant donné l'importance de ce transporteur lysosomal, une partie lui est consacrée dans la section « c) transporteurs lysosomaux » de ce mémoire.

Les senseurs d'acides aminés participent à activer le complexe Rag-Ragulator et donc à recruter mTORC1 aux lysosomes. L'activation des GTPases du complexe Rag fait intervenir une GAP constituée par un hétérodimère formé de foliculin (FLCN) et de Foliculin Interacting Protein (FNIP) 1 ou 2. Plus exactement, la GAP GATOR active Rag A/B, ce qui induit le recrutement de FLCN/FNIP qui, à son tour, active Rag C/D. (Meng & Ferguson, 2018).

4.2) Rôle émergent de C9orf72 à la surface des lysosomes

L'équipe ayant mis en évidence le rôle de FLCN/FNIP a identifié un domaine conservé dans les séquences des protéines FLCN et FNIP1/2 (Petit, Roczniak-Ferguson, & Ferguson, 2013) : le domaine DENN. Il s'agit d'un domaine conservé permettant l'interaction avec les petites GTPases (Marat, Dokainish, & McPherson, 2011). Ces chercheurs ont identifié deux protéines possédant ce domaine, C9orf72 et SMCR8, et un autre groupe a découvert qu'elles formaient un complexe avec une troisième protéine, WDR41 (Sullivan et al., 2016). Ce complexe C9orf72-SMCR8-WDR41 (complexe CSW) jouerait un rôle dans l'activation du complexe mTORC1, et il constituerait un nouveau type de senseur des niveaux d'acides aminés (J. Amick, Roczniak-Ferguson, & Ferguson, 2016). En effet, sa localisation est cytoplasmique tant que les niveaux de nutriments sont suffisants, mais en cas de carence en acides aminés, le complexe CSW est recruté au lysosome (Joseph Amick, Tharkeshwar, Amaya, & Ferguson, 2018). Cette localisation particulière revêt une importance cruciale dans les recherches de mon laboratoire d'accueil, puisqu'elle est permise par l'interaction avec le transporteur d'acides aminés cationiques PQLC2 étudié par le laboratoire. PQLC2 et cette interaction seront présentés en détail plus loin.

La protéine C9orf72 (Chromosome 9 Open Reading Frame 72), codée par le gène du même nom, a été identifiée pour la première fois chez l'homme en 2011 en raison de son implication dans deux pathologies neurodégénératives : la sclérose latérale amyotrophique (SLA) et les démences frontotemporales (DFT) (DeJesus-Hernandez et al., 2011). En effet, une mutation de ce gène consistant en une expansion héxanucléotidique GGGGCC constitue la cause la plus fréquente des formes génétiques de ces pathologies. Si les fonctions de cette protéine dans la cellule ne sont pas encore connues (en dehors de son rôle probable de GEF/GAP comme le laisse penser son domaine DENN), une partie semble en tout cas graviter autour des lysosomes. En effet, de nombreuses études ont rapporté des défauts d'autophagie chez les patients SLA/DFT associées à la mutation de C9orf72 (Al-Sarraj et al., 2011; Troakes et al., 2012), mais aussi dans les modèles murins (Ugolino et al., 2016) et les lignées cellulaires (Sellier et al., 2016; Webster et al., 2016; Webster, Smith, Grierson, & De Vos, 2018).

c) Les transporteurs de la membrane des lysosomes

Ce travail de thèse étudie l'implication de deux transporteurs lysosomaux d'acides aminés, la cystinosine et PQLC2, dans le développement embryonnaire chez la souris. Ils seront présentés en détail dans cette partie, après une introduction plus générale des transporteurs lysosomaux et de leurs particularités.

1) Les transporteurs lysosomaux : propriétés, rôles dans la signalisation cellulaire et pathologies associées

Comme mentionné dans la première partie, les nutriments produits par la dégradation lysosomale lors de processus tels que l'autophagie doivent être rendus disponibles pour la cellule. Comme ces nutriments (acides aminés, sucres etc.) sont incapables de traverser la membrane lysosomale par diffusion passive, leur transport jusqu'au cytosol implique l'action de protéines transmembranaires spécialisées.

1.1) Transport d'une molécule à travers une membrane biologique : les différentes modalités de passage

De manière générale, on distingue deux grandes modalités par lesquelles une molécule peut traverser une membrane biologique : le transport passif et le transport actif. Le transport passif est appelé diffusion facilitée lorsqu'il est médié par une protéine. Il permet le flux net d'un substrat d'un compartiment à un autre en suivant uniquement son gradient de concentration. A l'inverse, le transport actif permet de déplacer un substrat contre son gradient de concentration à l'aide d'une source d'énergie. Il se subdivise en deux catégories : (1) le transport actif primaire, qui utilise de l'énergie sous forme d'ATP par exemple (c'est le cas des 'pompes' ioniques comme la v-ATPase qui acidifie les lysosomes) ; (2) le transport actif secondaire, qui utilise un gradient électrochimique comme source d'énergie. Dans ce cas, le substrat est co-transporté avec un ion donné (symport) ou échangé avec un ion de l'autre côté de la membrane (antiport). Ces ions moteurs sont préalablement accumulé d'un côté ou l'autre de la membrane par un transporteur primaire.

Cette présentation simplifiée doit être complétée par la distinction suivante : les protéines transmembranaires chargées du déplacement d'une molécule d'un compartiment à un autre sont soit des canaux, soit des transporteurs. Schématiquement, les canaux sont soit ouverts et laissent passer leurs substrats (en général des ions) par diffusion à travers la membrane, soit fermés. Ce sont donc toujours des déplacements passifs qui sont à l'œuvre. Les transporteurs fonctionnent au contraire selon un mécanisme dit 'd'accès alterné', c'est-à-dire qu'ils adoptent une série de conformations dans lesquelles le site de liaison au substrat est exposé soit d'un côté de la membrane, soit de l'autre pour faire passer celui-ci à travers la membrane.

Ce mécanisme d'accès alterné ne sera pas plus détaillé ici, mais il est utile pour présenter un mode de transport particulier qui est celui d'uniport. Contrairement aux symporteurs et aux antiporteurs (transporteurs actifs secondaires), aucun ion n'est co-transporté avec le substrat chez les uniporteurs, ce sont donc des transporteurs passifs. Cependant, contrairement aux canaux, les uniporteurs fonctionnent selon ce mode d'accès alterné. Cela implique que leurs propriétés cinétiques sont drastiquement différentes de celles des canaux : ils sont plus lents, et par conséquent déplacent des quantités de matière bien moindres ; ainsi, si leur substrat est chargé électriquement, leur contribution à l'établissement d'un potentiel électrique de membrane est négligeable en comparaison de celle des canaux ioniques.

1.2) Le gradient électrochimique comme force motrice : Na^+ ou H^+ ?

Les transporteurs sont présents en grand nombre à la membrane plasmique des cellules, permettant ainsi à ces dernières de puiser dans leur environnement les nutriments dont elles ont besoin. Certaines cellules spécialisées, comme les entérocytes, expriment un grand nombre de transporteurs puisqu'elles sont chargées de l'absorption des nutriments produits par la digestion. De nombreux transporteurs membranaires utilisent le gradient de sodium comme force motrice, cet ion étant plus concentré dans le milieu extracellulaire que dans le cytosol. C'est aussi le cas de certains transporteurs de la membrane des lysosomes, tels que SNAT9 par exemple (Rebsamen et al., 2015). Cependant, et contrairement au cas de la membrane plasmique, la lumière de cet organite contient une forte concentration de protons, créant ainsi un gradient transmembranaire important avec le cytosol (environ 3 unités pH par rapport au cytosol soit mille fois plus concentrés). De nombreux transporteurs lysosomaux exploitent cette source d'énergie en co-transportant un proton avec leur substrat. L'acidité des lysosomes confère une autre propriété particulière à ces protéines : outre le fait qu'elles sont fréquemment glycosylées ou dépendent de la présence d'autres protéines glycosylées pour les protéger de la protéolyse, leur activité est également dépendante du pH. Cela peut être dû au fait qu'elles co-transportent un proton et/ou que la protonation de certains résidus de leur face luminale soit indispensable au maintien d'une conformation fonctionnellement active.

1.3) Les barrières à l'étude des transporteurs lysosomaux

L'étude des transporteurs lysosomaux fait face à un obstacle majeur : leur localisation subcellulaire, qui les rend plus difficilement accessibles que les protéines de la membrane plasmique. Pour contourner ce problème, deux approches sont possibles : (1) l'utilisation d'un modèle d'étude artificiel, comme par exemple l'expression ectopique d'un mutant de transporteur lysosomal à la membrane plasmique (technique employée au laboratoire, détaillée plus loin), ou encore la fabrication de protéoliposomes à partir d'une protéine recombinante ; (2) la purification de lysosomes, basée sur des approches biochimiques classiques combinant centrifugations différentielles et séparation isopycnique, ou sur des approches récentes d'immuno-isolement (Abu-Remaileh et al., 2017). On compte aussi des approches intermédiaires comme celle du 'lysosome géant' qui consiste à augmenter drastiquement le volume des lysosomes à l'aide d'agents chimiques, ou biologiques, ce qui permet d'envisager des approches d'électrophysiologie. L'avantage principal de la première catégorie d'approches (modèles artificiels) est qu'elle permet d'explorer facilement les aspects mécanistiques du transporteur comme par exemple la nature de sa force motrice ou ses propriétés cinétiques. En revanche, ces approches ont une pertinence physiologique moindre puisqu'elles masquent l'importance que pourraient avoir la composition de la lumière lysosomale ou des interacteurs moléculaires présents dans la cellule. La purification des lysosomes permet d'avoir un aperçu plus fidèle de la biologie d'un transporteur (par exemple son impact sur le métabolisme), mais les études fonctionnelles sont plus difficiles. L'ensemble de ces contraintes techniques fait qu'aujourd'hui, le nombre de transporteurs lysosomaux connus et bien caractérisés reste relativement faible.

1.4) Exemples de transporteurs lysosomaux connus

Mon laboratoire d'accueil a participé à la découverte et à la caractérisation de plusieurs transporteurs lysosomaux durant ces 20 dernières années. Il a notamment identifié ou aidé à identifier le transporteur d'acides aminés neutres LYAAT1 (Corinne Sagné et al., 2001), le transporteur de cobalamine ABCD4/LMBD1 (Gailus et al., 2010; Rutsch et al., 2009), les transporteurs d'acides aminés cationiques PQLC2 (Jezegou et al., 2012) et SLC7A14 (Jaenecke et al., 2012), le transporteur orphelin CLN7 (Sharifi et al., 2010), et le transporteur de glutamine SNAT7 (Verdon et al., 2017). En outre, ces chercheurs ont caractérisé les propriétés fonctionnelles du transporteur d'acide sialique, la sialine (Pietrancosta et al., 2012; Ruivo et al., 2008; C. Sagné & Gasnier, 2008) et du transporteur de cystine, la cystinosine (Kalatzis, Cherqui, Antignac, & Gasnier, 2001; Ruivo et al., 2009). Enfin, ils ont identifié avec des collaborateurs un grand nombre de transporteurs putatifs de la membrane du lysosome, encore orphelins (Chapel et al., 2013).

Le regard porté par la communauté scientifique sur les transporteurs lysosomaux a évolué parallèlement avec la prise de conscience que les lysosomes ne constituent pas uniquement des centres de recyclage, mais possèdent des rôles variés dans la signalisation et l'homéostasie cellulaire. Par exemple, le transcepteur SNAT9, dont le rôle de senseur d'acides aminés pour le complexe mTORC1 a été découvert en 2015, sera présenté en exemple dans la partie suivante. On citera aussi le transporteur orphelin spinster et le transporteur d'acides aminés LYAAT1, qui sont tous deux impliqués dans les phénomènes de fission autophagolysosomale et phagolysosomale, respectivement (Gan et al., 2019; Rong et al., 2011). Il existe d'autres cas de rôle biologique particulier, par exemple le transporteur d'histidine et de di/tripeptides PHT1 qui joue un rôle dans la réponse immunitaire innée en

rendant disponible dans le cytosol des peptidoglycanes bactériens qui stimulent la production de cytokines proinflammatoires (Hu, Song, Jiang, Nuñez, & Smith, 2018), ou encore le transporteur d'hème HRG1 indispensable au processus de recyclage des hématies (White et al., 2013). Ces transporteurs font donc partie des effecteurs moléculaires qui confèrent aux lysosomes leur nature de plateforme de contrôle de l'homéostasie cellulaire.

1.5) Exemple du transporteur lysosomal SNAT9, un senseur des niveaux d'acides aminés lysosomaux

SNAT9 fait partie de la famille des transporteurs SNAT (sodium coupled amino acid transporter), qui co-transportent un ion sodium avec leurs substrats. Plusieurs études ont rapporté la dépendance de SNAT9 au sodium (Rebsamen et al., 2015; Scalise et al., 2019), une propriété inhabituelle parmi les transporteurs lysosomaux. Notons que les premières expériences visant à caractériser son activité de transport décrivaient initialement SNAT9 comme un transporteur d'arginine (Rebsamen et al., 2015; S. Wang et al., 2015). Cependant, son Km pour l'arginine d'environ 4 mM (Wyant et al., 2017) est incompatible avec les concentrations estimées de cet acide aminé dans le lysosome (100 à 200 µM).

Une étude ultérieure plus détaillée a montré qu'il transporte en réalité plusieurs acides aminés essentiels (leucine, phénylalanine, isoleucine, tryptophane et valine) ainsi qu'un acide aminé non essentiel, la tyrosine. L'importance physiologique de son rôle d'exporteur de leucine a par ailleurs été démontrée, et est cohérente avec son Km pour cet acide aminé estimé à 90 µM (Wyant et al., 2017). Son affinité est donc bien meilleure pour la leucine que pour l'arginine. C'est aussi le cas de sa capacité de transport (V_{max}), environ 100 fois plus grande pour la leucine que pour l'arginine. Le groupe de D. Sabatini a aussi montré que la

perte de SNAT9 n'impacte pas les concentrations lysosomales d'arginine (Abu-Remaileh et al., 2017), ce qui s'explique par la présence d'autres transporteurs lysosomaux assurant le flux de cet acide aminé, en particulier le transporteur PQLC2 étudié dans cette thèse.

SNAT9 a aussi été décrit comme transporteur de glutamine, un autre groupe ayant récemment proposé une estimation du Km pour cet acide aminé d'approximativement 500 µM (Scalise et al., 2019). Cependant l'étude du groupe de David Sabatini n'a pas détecté d'impact significatif de la perte de ce transporteur sur les niveaux lysosomaux de glutamine. Par ailleurs, mon laboratoire d'accueil a montré que SNAT7 est le principal transporteur de glutamine à la membrane du lysosome (Verdon et al., 2017). Il est donc probable que l'activité de SNAT9 ne joue pas de rôle physiologique majeur dans le transport de cet acide aminé à travers la membrane lysosomale.

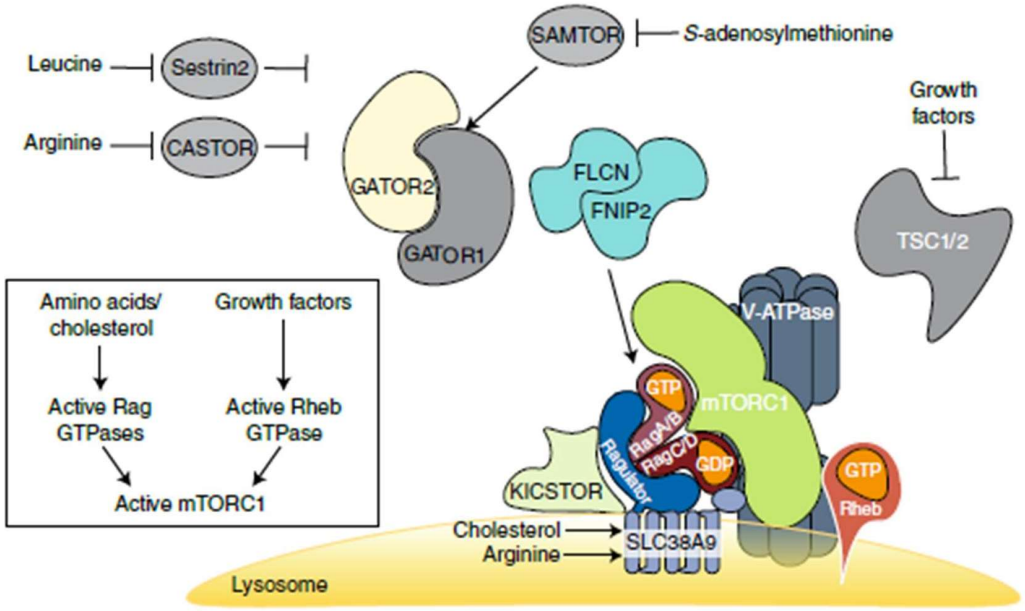


Figure 6 : Activation du complexe mTORC1 à la surface des lysosomes. mTORC1, chef d'orchestre de la croissance cellulaire, intègre divers signaux susceptibles de réguler son activité. Différents senseurs à la fois cytosoliques (CASTOR/SAMTOR/Sestrin) et lysosomaux (SLC38A9) informent le complexe sur la disponibilité des nutriments et notamment des acides aminés. Si ces derniers sont présents, mTORC1 est recruté à la surface des lysosomes (au niveau du complexe Rag-Ragulator) où il pourra ensuite être activé par la GTPase Rheb qui n'est elle-même active qu'en présence de facteurs de croissance.
Adapté de Lawrence & Zoncu, Nature Cell Biology 2019

Bien que SNAT9 ne transporte pas l'arginine efficacement, cet acide aminé régule sa capacité à exporter ses substrats véritables, c'est-à-dire les acides aminés aliphatiques branchés et aromatiques. La présence d'arginine à une concentration de 200 µM (soit 20 fois moins que son Km) double le V_{max} de transport de leucine (Wyant et al., 2017).

SNAT9 fonctionne aussi comme un senseur d'arginine pour mTORC1. En effet son absence inhibe fortement la réactivation de mTORC1 par l'arginine (mais pas par la leucine) après une carence en acides aminés (Jung et al., 2015; Rebsamen et al., 2015; S. Wang et al., 2015). Ce transporteur interagit physiquement avec le complexe Rag-Ragulator et est capable de moduler les Rag GTPases. Comme pour son activité de transport, l'interaction de SNAT9 avec le complexe Rag-Ragulator dépend de sa liaison à l'arginine, et ceci de manière dose-dépendante. Les mutants de SNAT9 incapables de lier l'arginine ou incapables d'interagir avec Rag-Ragulator ont tous deux le même effet sur mTORC1 que le KO complet, à savoir une absence de réactivation en réponse aux acides aminés. Cette activation des Rags semble dépendre en fait d'une activité GEF portée par SNAT9 et le complexe Ragulator (Shen & Sabatini, 2018) : Ragulator favoriserait le passage de RagC à l'état GTP à GDP, et inversement SNAT9 favoriserait le passage de RagA à l'état GDP à GTP en présence d'arginine. Cet état 'actif' RagA(GTP)/RagC(GDP) permet alors le recrutement de mTORC1 au lysosome. SNAT9 pourrait également activer mTORC1 de manière indirecte en libérant de la leucine dans le cytosol, qui active le senseur Sestrin. En plus de l'arginine, SNAT9 est aussi un senseur des niveaux de cholestérol (Castellano et al., 2017). Il joue donc un rôle critique pour informer le complexe mTORC1 sur la disponibilité en nutriments.

Ce mécanisme de senseur des niveaux d'acides aminés intra-lysosomaux est proposé comme étant un moyen pour la cellule de se prévenir contre un excès d'autophagie, en commençant

à l'inhiber celle-ci dès que les lysosomes ont produit suffisamment de nutriments. SNAT9 coordonnerait cette réponse en étant lui-même à la fois un effecteur dans l'homéostasie des acides aminés essentiels qu'il transporte, mais aussi un point de contrôle pour le coordinateur de la croissance cellulaire mTORC1.

L'étude du métabolome lysosomal publiée par le groupe de David Sabatini (Abu-Remaileh et al., 2017) décrit les modalités selon lesquelles la cellule régule ses niveaux intralysosomaux d'acides aminés. Dans cette étude, ils distinguent, d'une part, une population d'acides aminés (majoriairement essentiels) dont l'efflux lysosomal est contrôlé par mTORC1 via SNAT9 et, d'autre part, une population d'acides aminés dont l'export serait uniquement dépendant du gradient de pH lysosomal imposé par la vATPase, suggérant un contrôle accru (par le biais de mTOR) des niveaux d'acides aminés essentiels de la cellule. Un point intéressant est que cette deuxième population d'acides aminés ('contrôlés' par la vATPase mais pas par mTORC1) comprend l'arginine, dont la disponibilité est critique pour les fonctions de transport et de GEF de SNAT9.

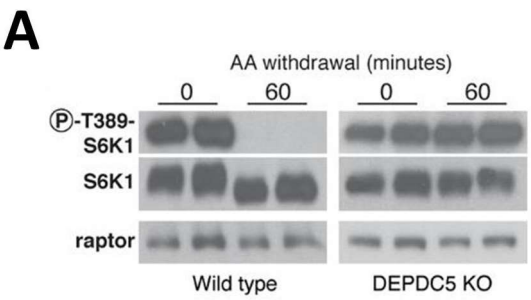
Ces deux articles du groupe de David Sabatini apportent des informations précieuses sur l'importance de l'arginine lysosomale. On notera notamment les points suivants :

1. La capacité de SNAT9 à interagir avec Rag-Ragulator est dispensable pour l'efflux de ses subtstrats mais elle est indispensable pour la réactivation de mTORC1 par les acides aminés. Par contre, la capacité de SNAT9 à lier l'arginine est cruciale autant pour son activité de transport que pour signaler à mTORC1 la présence de cet acide aminé.
2. Une carence sélective en arginine (1h) induit une accumulation des substrats de SNAT9 dans les lysosomes, similaire à celle observée lors de son inactivation complète. Par ailleurs, l'inhibition pharmacologique de la vATPase (par ConA ou BafA1, 1h) induit une

accumulation d'arginine intralysosomale (d'un facteur 3,5 environ) mais n'exacerbe pas pour autant l'efflux des substrats de SNAT9. Cela indique que la seule diponibilité en arginine dans la lumière lysosomale n'est pas suffisante pour activer SNAT9.

3. Lors d'une carence en acides aminés (1h), les niveaux intralysosomaux d'arginine varient très peu (diminution d'un facteur 1,6). En revanche, l'inactivation génétique de GATOR qui rend mTORC1 insensible à la carence et l'active constitutivement (figure 7 A), induit une diminution de la concentration intralysosomale d'arginine d'un facteur 12, donc beaucoup plus importante, lors d'une telle carence globale en acides aminés (figure 7 B et C). Inversement, l'inhibition pharmacologique de mTORC1 par la Torin (1h) n'a pas du tout le même effet puisqu'elle induit une faible augmentation (facteur 1,5) de la concentration intralysosomale d'arginine.

Ce troisième point est intéressant puisqu'il montre un comportement distinct de l'arginine par rapport aux autres acides aminés. On comprend que leur diminution globale lors d'une carence en l'absence de GATOR reflète le fait que les lysosomes fournissent des acides aminés à la cellule grâce à l'autophagie, une réponse qui reste inhibée dans ce cas en raison de l'activation constitutive de mTORC1. Mais il est surprenant de voir que l'arginine est l'acide aminé qui diminue le plus fortement (figure 7 C) et surtout qu'il s'agisse de la diminution la plus fortement exacerbée par la perte de GATOR (figure 7 D). A moins que l'autophagie soit censée produire une quantité particulièrement importante d'arginine, on peut imaginer que l'activité de mTORC1 régule (directement ou non) un transporteur d'arginine, qui n'est pas SNAT9. Il pourrait s'agir du transporteur PQLC2 étudié dans cette thèse. Comme son activité de transport est bidirectionnelle (voir plus loin), mTORC1 pourrait activer l'export lysosomal d'arginine par PQLC2 et/ou inhiber son activité d'import.



Metabolite	Fold change (wild type lysosome starved/unstarved)	Fold change (DEPDC5 KO lysosome starved/unstarved)
taurine	3,121	0,567
valine	2,371	0,734
aspartate	2,045	0,499
proline	1,936	0,542
alanine	1,918	0,579
lysine	1,721	0,435
glutamate	1,558	0,364
histidine	1,025	0,319
leucine	0,891	0,197
asparagine	0,853	0,284
threonine	0,765	0,368
phenylalanine	0,654	0,228
tryptophan	0,624	0,376
serine	0,618	0,334
arginine	0,617	0,083
glutamine	0,607	0,174
cystine	0,476	0,303
methionine	0,455	0,240
tyrosine	0,395	0,281
isoleucine	0,185	0,100

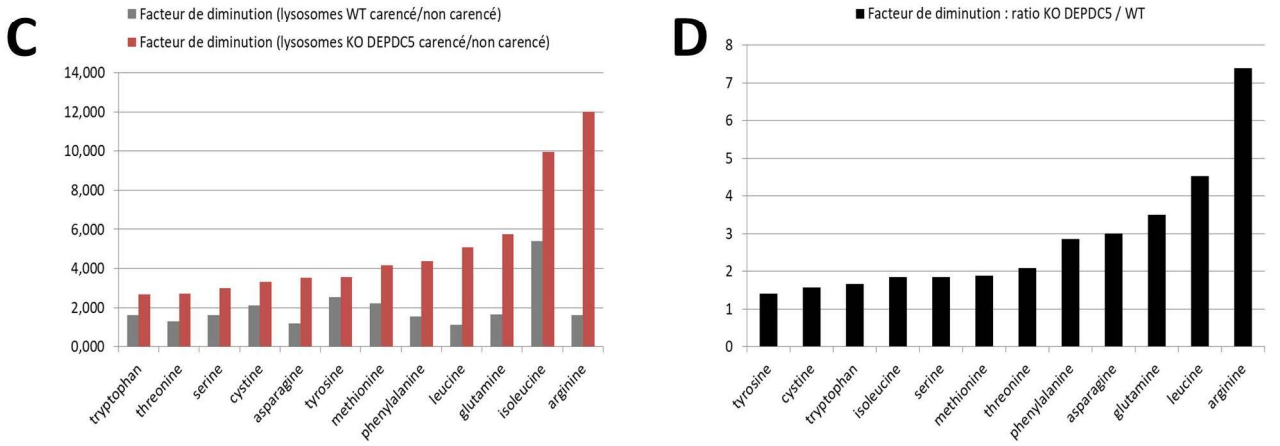


Figure 7 : Relation particulière entre les niveaux d'arginine luminale et l'activation de mTORC1 par les acides aminés. Issus des données supplémentaires de Abu-Remaileh et al., Science 2017. **(A)** Le KO de DEPDC5 permet la perte de GATOR, point de convergence des différents senseurs cytosoliques d'acides aminés. Par conséquent, mTORC1 n'est pas inactivé par la carence en acides aminés. **(B)** Les auteurs s'intéressent aux niveaux intralysosomaux de divers métabolites . Ils trouvent que lors d'une carence en acides aminés (1h), les niveaux augmentent ou diminuent selon la molécule ; en revanche si cette carence a lieu lorsque mTORC1 est incapable de sentir cette carence (mutant DEPDC5), les niveaux de tous les métabolites diminuent, vraisemblablement parce que l'inhibition de mTORC1 sur l'autophagie est maintenue. **(C et D)** Focus sur uniquement sur les métabolites lysosomaux qui diminuent et représentation **(C)** du facteur de diminution de chaque génotype et **(D)** du ratio facteur de diminution des mutants DEPDC5 sur celui des WT.
Adapté de Abu-Remaileh et al., Science 2017 et données supplémentaires

1.6) Les maladies de surcharge lysosomale

Les transporteurs lysosomaux sont en réalité étudiés depuis longtemps, non pas en raison de leurs rôles signalétiques, mais en raison de leur implication dans certaines pathologies rares. En effet, les dysfonctionnements des lysosomes induisent un ensemble de pathologies génétiques rares, appelées maladies de surcharge lysosomale (MSL). Ces maladies sont

caractérisées par l'accumulation à l'intérieur de la lumière du lysosome d'une macromolécule ou d'un catabolite issu de sa dégradation. Il peut y avoir deux causes à cela : (1) la perte de fonction d'une enzyme lytique, ce qui induit l'accumulation d'un produit intermédiaire de la voie de dégradation ; ou (2) la perte de fonction d'un transporteur de la membrane, induisant ainsi une accumulation de son ou ses substrat(s) à l'intérieur de la lumière. Dans le premier cas, on peut citer par exemple la maladie de Pompe (accumulation de glycogène), les maladies de Gaucher (accumulation de glucocérébroside), de Niemann-Pick (accumulation de sphingomyéline) ou encore de Fabry (accumulation de différents sphingolipides). Dans le second cas, on mentionnera les maladies de stockage de l'acide sialique (Salla et ISSD) ou de la vitamine B12 ; mais la plus connue est la maladie de surcharge lysosomale en cystine, la cystinose. Cette pathologie est causée par une inactivation de la cystinosine, le transporteur lysosomal de cystine. Elle sera décrite plus en détail ultérieurement.

Il n'existe pas de traitements pharmacologiques curatifs pour ces maladies. Certaines peuvent être prises en charge par des traitements ciblant les symptômes. Parmi les approches explorées, on compte la thérapie par remplacement enzymatique, qui consiste à fournir directement au patient l'enzyme manquante (dans le cas où la MLS est causée par la perte d'une enzyme) ou la thérapie par chaperons pharmacologiques qui vise à stabiliser la conformation active de la protéine mutée et à rétablir son acheminement aux lysosomes. Depuis plusieurs années, les progrès réalisés dans le domaine de la thérapie génique et cellulaire propulsent ces approches comme des options de choix pour le traitement des MLS.

2) *La cystinosine, transporteur lysosomal de cystine*

2.1) La cystinosine et la maladie génétique rare cystinose

La cystinosine est le membre fondateur d'une famille de protéines dites à motif PQ, qui sont des protéines possédant 7 domaines transmembranaires et des motifs caractérisés par une paire proline – glutamine conservée (en général deux motifs PQ) (figure 8). Cette famille présente un certain nombre de similarités structurales avec les SWEET, des transporteurs de sucres, et leurs homologues bactériens les semi-SWEET (Lee, Nishizawa, Yamashita, Ishitani, & Nureki, 2015; Tao et al., 2015).

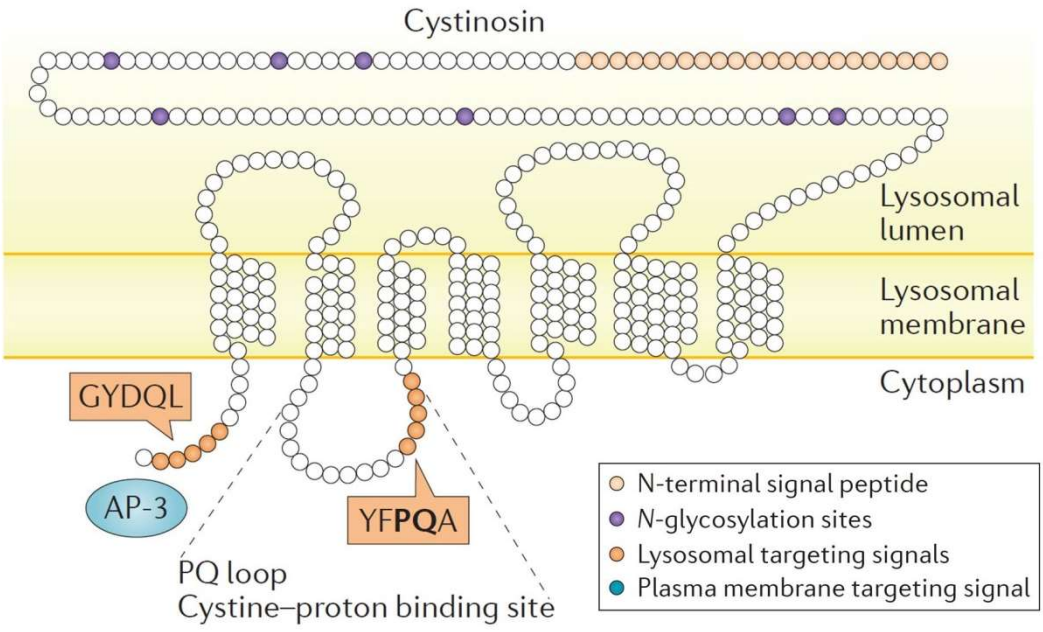


Figure 8 : Topologie de la cystinosine. Organisation du transporteur cystinosine dans la membrane du lysosome.
Adapté de Cherqui & Courtoy, Nature Reviews 2017

La première protéine à motif PQ à avoir été identifiée est donc la cystinosine, codée par le gène *CTNS* situé sur le chromosome 17 chez l'homme (Town et al., 1998). Il s'agit d'un transporteur de cystine, la forme oxydée de la cystéine. La cystinosine co-transporte un

proton avec son substrat (Kalatzis et al., 2001). Elle utilise donc le gradient de protons entre la lumière lysosomale (pH 4,5 – 5,0) et le cytosol (pH 7,0 - 7,4) comme force motrice pour exporter activement la cystine vers le cytosol. Cette protéine a été étudiée par de nombreux groupes en raison de ses implications cliniques. En effet, des mutations causant l'inactivation du gène ou la production d'une forme non fonctionnelle de la cystinosine sont à l'origine d'une maladie génétique rare appelée cystinose. Chez ces patients, la cystine s'accumule en quantités importantes dans les lysosomes car elle n'est plus exportée. Cette molécule proviendrait surtout de la dégradation de protéines contenant des ponts disulfures plutôt que l'oxydation de la cystéine lysosomale en cystine (Thoene & Lemons, 1982).

Cette accumulation de cystine lysosomale s'aggrave au cours de la vie des patients, allant jusqu'à former des cristaux de cystine, ce qui cause des dysfonctionnements de plusieurs organes (voir ci-après). Cependant, l'organe le plus touché est le rein, la cystinose étant la cause génétique la plus courante du syndrome de Fanconi, c'est-à-dire d'une perte de fonction des tubules proximaux rénaux.

On distingue trois formes cliniques de cystinose : (1) la forme néphropathique infantile, qui représente la majorité des cas diagnostiqués (>95%), (2) la forme néphropatique juvénile qui présente des symptômes similaires à la première forme, mais dont l'apparition est plus tardive et les symptômes moins sévères, et (3) la forme non néphropatique, qui, comme son nom l'indique, ne présente pas de symptômes rénaux, et dans laquelle le symptôme oculaire prédomine. Ainsi, la sévérité et les caractéristiques cliniques de cette maladie peuvent varier, de même que son incidence (1 cas sur 20 000 à 100 000 selon les régions). Comme la forme néphropatique infantile est la plus répandue, elle sera référée dans la suite de ce texte simplement comme « cystinose ».

Chronologiquement, les patients cystinotiques souffrent en premier lieu du syndrome de Fanconi, qui est détectable dès la première année de vie d'un nouveau-né, et qui s'aggrave ensuite (glomérulopathie) et évolue ensuite vers une insuffisance rénale dès l'âge de 6 ans (de plus amples détails sur cet aspect de la maladie seront apportés en partie B.c.1.2). Assez rapidement durant l'enfance, la formation de cristaux de cystine dans la cornée (figure 9 A) cause une photophobie et peut, dans le pire des cas, évoluer en rétinopathie et causer la cécité (Gahl, Kuehl, Iwata, Lindblad, & Kaiser-Kupfer, 2000). Plus tard, des symptômes additionnels apparaissent : hypothyroïdisme, diabète, hypogonadisme et hypertension. Enfin, au cours de leur vie les patients cystinotiques souffrent d'une déminéralisation progressive des os, ce qui cause leur déformation et leur fragilité (Bacchetta et al., 2016). Dans certains cas, la cystinose est également associée à des troubles moteurs et cognitifs.

2.2) Pharmacothérapie de la cystinose par la cystéamine

Avant l'émergence d'un traitement, les patients cystinotiques mourraient autour de l'âge de 10 ans des suites d'une déficience de leur système rénal. A partir des années 70, les patients ont commencé à être traités pharmacologiquement avec de la cystéamine (Thoene, Oshima, & Crawhall, 1976), leur espérance de vie a ainsi augmenté (voir plus loin). C'est en réalité cet allongement de la vie des patients qui a permis de mettre en évidence d'autres symptômes de la cystinose et de se rendre compte que la maladie était en fait multisystémique. La cystinosine étant une protéine ubiquitaire, cela n'est pas étonnant.

L'étude et la compréhension de cette maladie doit beaucoup à la mise au point d'un modèle d'étude animal. Le premier modèle murin de la cystinose a été mis au point par le groupe de Corinne Antignac (Stéphanie Cherqui et al., 2002). Ces souris mutantes accumulent de la

cystine dans leurs lysosomes où cette dernière forme des cristaux. Cette accumulation est progressive et s'aggrave à partir de 8 mois d'âge. Elle affecte particulièrement le foie, les reins, les muscles et le cerveau. Ces souris présentent des défauts oculaires et osseux qui miment la pathologie humaine. De manière surprenante, l'apparition des défaillances rénales, qui sont pourtant le symptôme clinique le plus sévère de la cystinose chez l'homme, n'apparait que chez les souris de fond génétique C57BL/6 (Nathalie Nevo et al., 2010). Sur ce fond génétique, l'accumulation de cystine dans les reins est également plus marquée. Enfin, elles répondent bien à la cystéamine. Ces animaux constituent un atout précieux pour envisager de nouvelles approches pour traiter la cystinose. Cependant, il existe une différence importante entre la maladie humaine et le modèle murin : chez les souris la perte de la cystinosine n'a pas d'impact sur la croissance, la fertilité et la longévité. Le phénotype murin est donc bien moins sévère.

Bien que la galénique ait évolué et qu'il y ait eu des progrès sur la cinétique de libération de cette molécule, la cystéamine reste depuis plus de 40 ans le seul traitement efficace disponible pour les patients. La molécule ayant une demi-vie courte, la prise du médicament doit être effectuée toutes les 6 heures, bien qu'une nouvelle formulation permette désormais de doubler le temps entre chaque prise (Veys et al., 2016). De plus, la cystéamine induit différents effets secondaires tels que l'halitose, la nausée et des spasmes intestinaux. Il s'agit donc d'un traitement lourd et impactant la qualité de vie des patients, d'où un défaut d'observance fréquent chez ces derniers, en particulier à l'adolescence, et une aggravation subséquente des symptômes. En outre, il s'agit d'un traitement symptomatique et non curatif. On sait désormais que plus la prise en charge de la maladie se fait tôt, plus on peut retarder ses effets (Emma et al., 2014). En conclusion, la cystéamine a permis une réelle amélioration de la prise en charge de la cystinose, mais ce traitement est lourd, et il est loin d'être parfait puisqu'il

n'empêche pas la progression de la maladie. Les patients cystinotiques traités avec la cystéamine ont ainsi une espérance de vie d'environ 30 à 35 ans (Nesterova & Gahl, 2008). Les recherches thérapeutiques sur la cystinose exploitent aussi des approches non pharmacologiques : le premier essai de thérapie cellulaire a eu lieu en octobre 2019. Cette voie est prometteuse mais hélas encore balbutiante.

Des travaux anciens avaient suggéré que la déplétion de cystine des lysosomes cystinotiques traités par la cystéamine dépendrait de l'activité du « système c » (pour cationique), nom par lequel était désigné le(s) transporteur(s), encore non identifié, responsable du flux d'acides aminés cationiques à travers la membrane des lysosomes (Ronald L Pisoni, Thoene, Christensen, & Biol, 1985; Ronald L Pisoni, Thoene, Lemons, & Christensen, 1987). Mon laboratoire d'accueil et celui de Xiaochen Wang à Pékin ont découvert en 2012 l'identité de ce transporteur, baptisé "PQ-loop containing protein 2", ou PQLC2 (Jézégou et al., 2012; Liu, Du, Rutkowski, Gartner, & Wang, 2012). Cette protéine, qui transporte l'arginine, la lysine, l'histidine et l'ornithine à travers la membrane lysosomale, est présentée dans la section suivante.

3) PQLC2, un transporteur lysosomal d'acides aminés cationiques

3.1) Découverte de PQLC2 et rôle dans l'action de la cystéamine

Dans l'une de ces études (Jézégou et al., 2012), l'équipe a mis en évidence le rôle central de PQLC2, d'une part dans l'efflux de lysine lysosomale et, d'autre part, dans le traitement pharmacologique de la cystinose. En effet, le silencing de PQLC2 ralentit l'efflux de lysine des

lysosomes, ainsi que la clairance de cystine hors des lysosomes dans des fibroblastes de patients cystinotiques traités à la cystéamine. Le mécanisme d'action proposé de la molécule est le suivant : en entrant dans le lysosome, à priori par diffusion passive, la cystéamine réduit une molécule de cystine en deux molécules de cystéine, puis forme un disulfure mixte cystéine-cystéamine. Cette molécule nouvellement formée est ensuite reconnue et transportée hors du lysosome par PQLC2 (figure 9 B), ce qui s'explique par la similarité structurale antre ce disulfure mixte et la lysine. L'autre molécule de cystéine résultant de la réduction de la cystine est quant à elle évacuée par un transporteur encore non identifié. Le groupe de Xiaochen Wang a démontré un mécanisme similaire dans un modèle de cystinose chez *C. elegans* (le nom de l'orthologue de PQLC2 chez cette espèce est LAAT-1) (Liu et al., 2012).

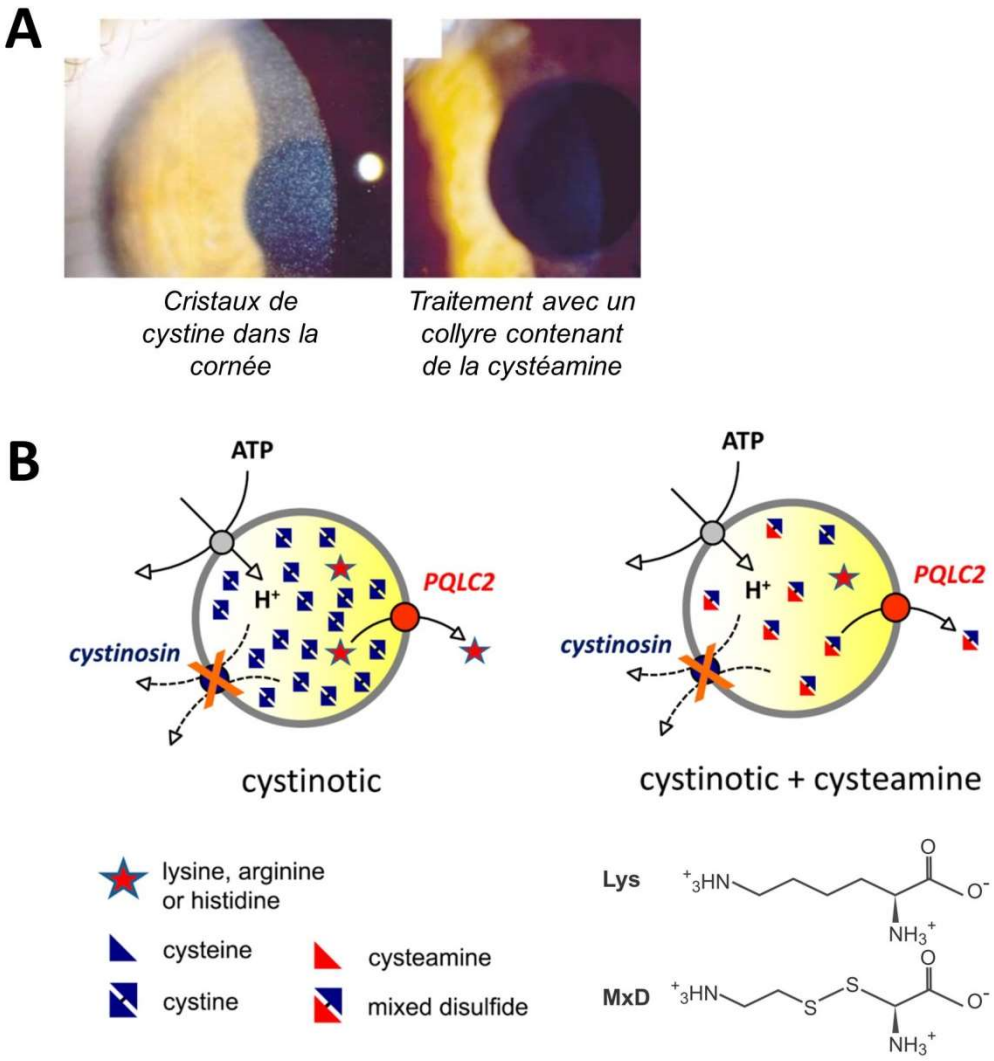


Figure 9 : Pharmacothérapie de la cystinose par la cystéamine. **(A)** Exemple d'application de cystéamine sous la forme de collyre pour éliminer les cristaux de cystine dans la cornée de patients cystinotiques. **(B)** Mode d'action de la cystéamine : la molécule rentre dans les lysosomes par une voie inconnue et réagit avec la cystine pour former un disulfure mixte (MxD) structurellement analogue à la lysine ; le MxD est ensuite exporté hors des lysosomes par le transporteur d'acides aminés cationiques PQLC2, permettant ainsi la clairance de la cystine lysosomale.
Adapté de Gahl et al., NEJM 2002 et de Jézégou et al., PNAS 2012

3.2) Propriétés mécanistiques de PQLC2

Durant sa thèse, Xavier Leray a largement contribué à caractériser les propriétés mécanistiques de PQLC2 par une approche d'électrophysiologie. Pour cette étude, il a utilisé un modèle d'ovocyte de Xénope dans lequel est injecté un ARNm codant pour le transporteur

délocalisé à la membrane plasmique grâce à une mutation de son motif de ciblage lysosomal (LL/AA) et couplé à la GFP. La face luminale de la protéine est exposée du côté extracellulaire, qui est maintenu à pH 5 pour mimer l'acidité de la lumière lysosomale. Ce système fonctionne donc comme un "lysosome géant inversé", c'est-à-dire que l'efflux lysosomal d'acides aminés, peu accessible, est remplacé par un influx cellulaire. Les substrats de PQLC2 étant chargés positivement, il est possible d'utiliser une technique d'électrophysiologie (méthode de Voltage Clamp à deux électrodes) pour mesurer l'activité de transport, et éventuellement de coupler cette méthode avec des mesures de flux de substrat radioactif ou des mesures de pH intracellulaire (figure 10 A). Enfin, l'intérêt d'exprimer la protéine délocalisée dans des ovocytes de Xénopes plutôt que dans des cellules humaines est que les premières expriment peu de transporteurs endogènes d'acides aminés cationiques, ce qui améliore fortement le rapport signal/bruit.

Par cette approche, Xavier a pu mettre en évidence que PQLC2 ne co-transporte pas de protons, contrairement à la majorité des transporteurs lysosomaux. Il ne co-transporte pas non plus d'autres cations (Na^+, K^+, Ca^{2+}), et agit donc comme un uniporteur (figure 10 C). Bien que son activité nécessite un pH luminal acide (par un contrôle cinétique), le gradient de protons ne définit pas le sens dans lequel il transporte ses substrats ; la force motrice de PQLC2 est en réalité le gradient de concentration de ses substrats et le potentiel de membrane du lysosome (figure 10 B). Ce dernier point suggère que son activité pourrait être indirectement modulée par les canaux ioniques lysosomaux, qui contribuent à l'établissement de ce potentiel.

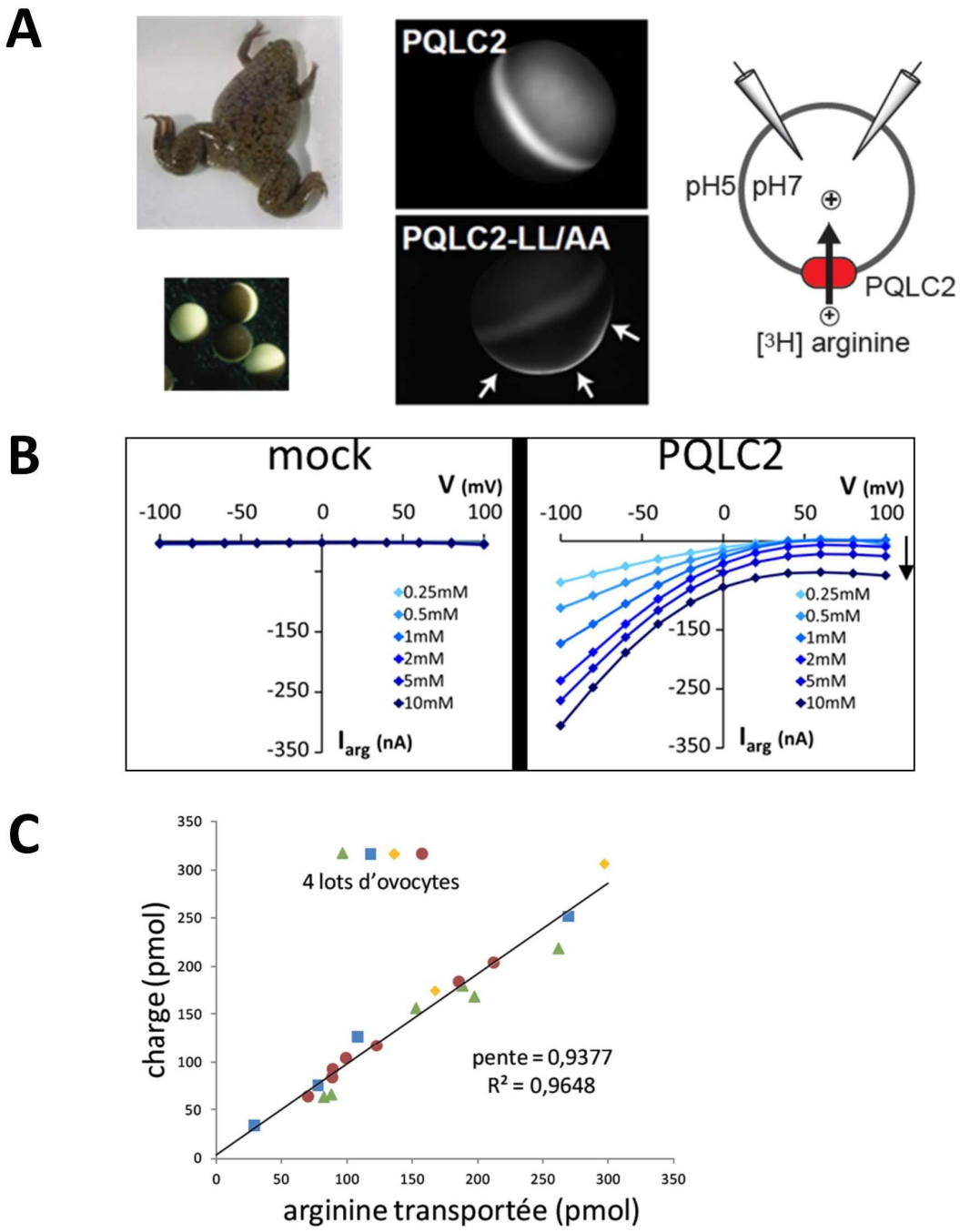


Figure 10 : Résultats antérieurs non publiés du laboratoire sur la caractérisation mécanistique de PQLC2. (A) Modèle de 'lysosome géant inversé' : des ARNm codant pour un mutant de ciblage de PQLC2 couplé à la GFP sont injectés dans des ovocytes de *Xenopus laevis* puis l'expression à la membrane est vérifiée en visualisant la fluorescence. La face luminale du transporteur faisant face au milieu extracellulaire, ce dernier est maintenu à un pH acide pour mimer l'environnement lysosomal. L'activité de PQLC2 est suivie en mesurant le courant évoqué par le passage de ses substrats (en Two Electrodes Voltage Clamp) et/ou en mesurant l'accumulation de substrat radioactif. **(B)** Le transport d'arginine par PQLC2 est dépendant du potentiel électrique de membrane. **(C)** PQLC2 ne co-transporte pas de molécule chargée avec ses substrats (uniport).
Xavier Leray, données non publiées, adapté avec autorisation

3.3) PQLC2 permet le recrutement du complexe C9orf72-SMCR8-WDR41 aux lysosomes

Une étude récente a permis de mettre en évidence que le recrutement du complexe C9orf72-SMCR8-WDR41 aux lysosomes (qui se produit lors d'une carence en acides aminés ; voir plus haut section A.b.4.2, page 42) dépend de l'interaction entre la sous-unité WDR41 et PQLC2 (Joseph Amick, Tharkeshwar, Talaia, & Ferguson, 2020) (figure 11 A et B). PQLC2 sert donc de point d'ancrage au complexe pour remplir sa ou ses fonction(s) à la surface du lysosome ; c'est une information capitale car en dehors de travaux rapportant une implication putative de PQLC2 dans le cancer de l'estomac (Jeung et al., 2019), c'est la première mise en évidence d'une fonction de cette protéine autre que le transport d'acides aminés. De manière intéressante, ces auteurs montrent aussi que lorsque PQLC2 transporte activement un de ses substrats, le complexe C9orf72 se dissocie des lysosomes, suggérant ainsi que les changements conformationnels induits par l'activité du transporteur influencent directement la liaison du complexe C9orf72 à la surface des lysosomes. PQLC2 agirait donc comme un transcepteur, c'est-à-dire comme une protéine membranaire agissant à la fois comme un transporteur et comme un récepteur. Par ailleurs, cette étude rapporte que l'absence de PQLC2 diminue la réactivation du complexe mTORC1 par les acides aminés cationiques après une carence. Cette activation réduite serait directement liée à l'incapacité de recruter le complexe C9orf72 au lysosome, ce dernier jouant par conséquent le rôle d'activateur de mTORC1. Ces données sont particulièrement intéressantes puisqu'elles permettent d'établir un lien entre ce transporteur et un régulateur central de l'homéostasie cellulaire ; elles sont cependant à nuancer, et leur robustesse sera discutée plus loin dans ce manuscrit.

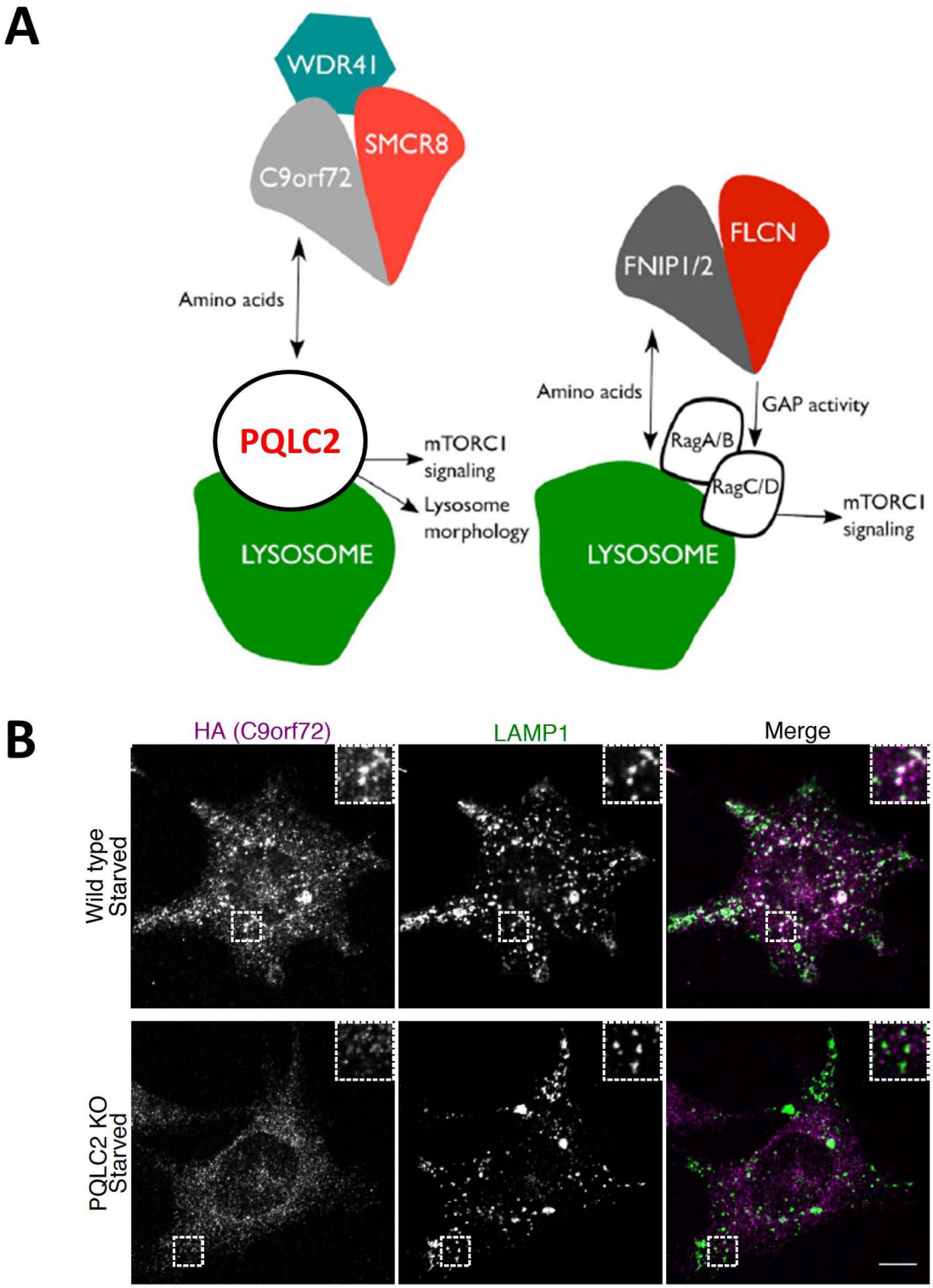


Figure 11 : PQLC2 recrute le complexe C9orf72 aux lysosomes lors d'une carence en acides aminés. (A) Le complexe formé de C9orf72, SMCR8 et WDR41 est recruté aux lysosomes lorsque les concentrations en acides aminés sont basses grâce à l'interaction entre PQLC2 et WDR41. **(B)** L'absence de PQLC2 empêche le recrutement du complexe C9orf72 lors d'une carence en acides aminés.
Adapté de Amick et al., Traffic 2017 et J. Cell Biol. 2020

B) ROLE DU SAC VITELLIN ET DE LA DEGRADATION LYSOSOMALE DANS LA NUTRITION PRECOCE DE L'EMBRYON DE MAMMIFERE

L'étude du développement embryonnaire est une branche très ancienne de la biologie, qui a longtemps tiré parti de modèles animaux ovipares tels que les amphibiens ou les oiseaux en raison de la facilité d'accès aux embryons qu'offre leur développement externe. Plus récemment, l'avènement de la biologie moléculaire a permis des avancées formidables dans l'étude du développement embryonnaire chez les mammifères, ainsi que dans l'identification des acteurs moléculaires de ces processus complexes. On sait désormais que, malgré les grandes différences entre les différentes espèces de vertébrés à l'âge adulte, les premières étapes de leur développement embryonnaire sont globalement conservées : fertilisation, clivage, blastulation, gastrulation et neurulation, l'organogénèse venant ensuite, mais avec des différences inter-espèces plus importantes. Cette section n'a pas vocation à décrire ces étapes dans le détail, mais je vais m'efforcer de donner un aperçu des mécanismes susceptibles d'entrer en jeu dans le phénomène de létalité embryonnaire synthétique que nous observons chez le double KO murin de *Pqlc2* et *Ctns*. En particulier, je me focaliserai sur un tissu extra-embryonnaire, le sac vitellin, et présenterai le rôle qu'il joue dans la nutrition de l'embryon chez la souris.

a) La neurulation et sa dépendance à la disponibilité en nutriments

Comme nous allons le voir dans la partie résultats, le phénotype des embryons de souris que nous avons étudié semble s'exprimer particulièrement au niveau cérébral, ce qui nous a poussés à étudier d'éventuelles défaillances dans la formation du système nerveux.

1) Neurulation et formation du système nerveux

Au terme de la gastrulation, l'embryon de vertébré s'organise en trois feuillets distincts : l'ectoderme, le mésoderme et l'endoderme. Au niveau du pôle dorsal de l'embryon, le centre organisateur de Spemann (constitué entre autres par le mésoderme chordal et somitique) induit la détermination progressive de l'ectoderme sus-jacent en neurectoderme. Ce phénomène dépend de la sécrétion de signaux dorsalisants tels que Noggin, Chordin, Follistatin ou encore Frizbee. Plus exactement, ces morphogènes inhibent des voies de signalisation ventralisantes, telles que BMP4 (Bone Morphogenic Protein 4) ou Wnt (Wingless Integrated, dont le nom vient de la contraction du gène Wingless de la drosophile et du site d'intégration Int-1 du virus murin de tumeur mammaire).

Durant la neurulation proprement dite, le neurectoderme forme une plaque neurale sur la face dorsale de l'embryon. Elle acquiert rapidement une structure en forme de raquette, étant plus large au niveau rostral et plus resserrée au niveau caudal, ceci étant rendu possible par des mouvements d'extension-convergence. Ensuite, des replis appelés crêtes neurales se forment en bordure de la plaque neurale, puis s'élèvent et convergent progressivement. Ce

mouvement d'élévation donne à la plaque neurale une forme recourbée appelée gouttière neurale. Mais, chez les mammifères, ce phénomène ne se produit pas de manière homogène dans l'espace et dans le temps (Sadler, 2005).

En effet, on distingue trois zones charnières qui constituent des points de fermeture le long de la gouttière neurale. Chez la souris, la fermeture est initiée en premier lieu au stade de développement E8,5 (embryonic day 8,5), au niveau de la jonction entre le rhombencéphale et la région cervicale (premier site, figure 12 A). Elle se poursuit ensuite à la fois en direction du pôle rostral (antérieur) et du pôle caudal (postérieur). Puis, deux autres sites d'initiation de la fermeture apparaissent au niveau céphalique, l'un au niveau de la jonction entre le mésencéphale et le prosencéphale (second site), et l'autre au pôle le plus rostral du prosencéphale (troisième site) (figure 12 B). La fermeture de la gouttière va également se poursuivre à partir de ces sites, et lorsqu'elle se termine aux alentours d'E10 elle forme alors un tube. L'ensemble de ces étapes constitue la neurulation primaire (Jean-François Colas and Schoenwolf, 2001; Copp and Greene, 2013). La neurulation secondaire consiste quant à elle en l'acquisition de l'organisation définitive du tube neural, c'est-à-dire une structure cylindrique avec une couche épithéliale au contact d'une lumière centrale, flanquée latéralement par les somites et recouverte au niveau dorsal par une couche d'épiderme externe.

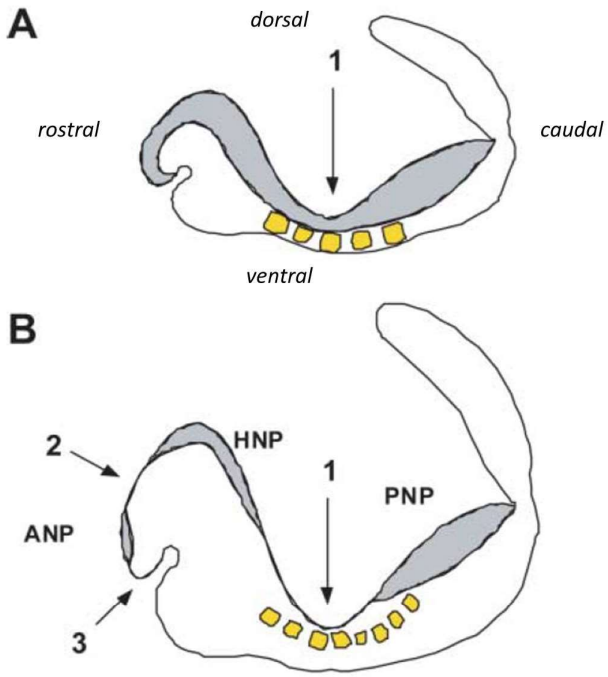


Figure 12 : Points charnières de fermeture du tube neural chez la souris. **(A)** Au stade E8,5 les crêtes neurales commencent à se rapprocher au niveau du point 1 ; **(B)** Au stade E9 le tube neural s'est refermé au niveau du point 1 et les crêtes neurales se rapprochent au niveau de deux autres zones charnières 2 et 3. On distinguera donc 3 neuropores : antérieur (ANP), postérieur (PNP) et rhombencéphalique (hindbrain, HNP) jusqu'à ce que le tube neural soit complètement fermé.
Adapté de Copp, J. Anat. 2005

Il est important de noter à ce stade que le processus de neurulation désigne la mise en place du tube neural, qui préfigure le futur plan d'organisation du système nerveux de l'organisme, et non la neurogénèse, c'est-à-dire l'apparition des types cellulaires de la lignée neuronale (tels qu'on les retrouve dans le cerveau à l'âge adulte). L'apparition des premiers neurones à partir des cellules souches du tube neural intervient plus tard dans le développement.

Des membres de la famille des BMP ainsi que des Wnt (via la voie de polarité planaire) interviennent dans le contrôle de la neurulation, mais tous les acteurs moléculaires impliqués ne sont pas encore connus. Il apparait cependant que le morphogène Sonic Hedgehog (Shh) joue ici un rôle particulièrement critique. Shh participe d'une part à l'établissement de la polarité dorso-ventrale dans le tube neural et les somites adjacentes (Echelard et al., 1993), et d'autre part plus précocement aux mouvements d'élévation et de repliements des crêtes

neurales (Ybot-Gonzalez, Cogram, Gerrelli, & Copp, 2002; Ybot-Gonzalez et al., 2007). La neurulation est un processus d'une grande complexité et d'une importance centrale dans le développement embryonnaire. Aussi, il n'est pas surprenant de constater que des défauts associés à cette étape sont à l'origine de diverses pathologies.

2) Les défauts de neurulation

Parmi les malformations congénitales recensées chez l'homme, certaines sont liées à des problèmes de formation du tube neural ou à un délai anormal dans sa fermeture. Ces pathologies sont regroupées sous le nom générique de malformations du tube neural, ou Neural Tube Defects (NTD) en anglais. Elles se répartissent en deux grandes catégories, qui présentent des symptômes cliniques très différents :

- *Les NTDs impactant le tube neural en dehors de la région crânienne*. On compte notamment le cas des « spina bifida » qui peuvent être pratiquement asymptomatiques (spina bifida occulta), ou former une protrusion au niveau de la colonne vertébrale entrainant une paralysie partielle (spina bifida myéloméningocèle) ou encore causer une exposition complète de la moelle épinière (spina bifida ouverte, non viable).

- *Les NTDs de la région cérébrale*. Les formes les plus courantes affectent le prosencéphale, avec l'anencéphalie (absence de formation de l'encéphale) et l'exencéphalie (défaut de formation du crâne entrainant un développement externe du cerveau). Plus rares, on compte aussi les cas de craniorachischisis qui affectent des

régions plus larges, incluant les autres segments du tube neural céphalique (mésencéphale et rhombencéphale) et les cervicales. Les NTDs cérébrales ne sont pas viables.

Il existe par ailleurs d'autres cas cliniques de défauts congénitaux qui ne sont pas des malformations du tube neural à proprement parler, mais qui affectent le cerveau des nouveau-nés. Par exemple, l'hydrocéphalie est causée par un blocage de la circulation du fluide cérébrospinal, lequel s'accumule et induit une augmentation de pression qui altère le développement du cerveau.

De manière intéressante, il est possible d'établir une relation entre des défauts sur des sites de fermeture spécifiques et des formes particulières de NTD. Par exemple, les atteintes crâniennes comme l'exencéphalie et l'anencéphalie sont associées à un défaut au niveau du second et du troisième site de fermeture du tube neural, respectivement. Un problème au niveau du premier site de fermeture aura en revanche des conséquences moins focalisées comme la craniorachischisis (Marco & Merello, 2006).

3) Lien entre neurulation et nutrition

Actuellement, la méthode employée pour prévenir les NTDs consiste en une supplémentation du régime alimentaire en folate (vitamine B9) à hauteur de 4 mg par jour durant la grossesse, ce qui permet d'atteindre une réduction de 20% à 30% de l'incidence de ces maladies (Pitkin, 2007).

Il existe deux voies par lesquelles le folate peut atteindre l'embryon : le transporteur SLC19A1, et le récepteur soluble du folate de type 1 (en anglais Folate Receptor 1, ou Folate Binding Protein 1, FBP1). Ce dernier nécessite, pour être endocyté dans la cellule, l'action d'un complexe récepteur multiligand formé de la mégaline, la cubiline et la protéine amnionless (les autres rôles de ce complexe seront détaillés plus loin). L'inactivation du gène *Lrp2*, codant pour la mégaline, ou de *Folbp1*, codant pour le FBP1, induisent un phénotype embryonnaire de NTD (Spiegelstein et al., 2004; Spoelgen et al., 2005). C'est aussi le cas du KO de *Slc19a1* (Toriyama, Toriyama, Wallingford, & Finnell, 2017). Ces deux voies d'entrée du folate ne sont donc pas redondantes, mais complémentaires.

On notera que la perte de *Slc19a1* induit une augmentation de la transcription de *Lrp2*, et inversement (Gelineau-van Waes et al., 2008; Kur, Mecklenburg, Cabrera, Willnow, & Hammes, 2014), mais cette réponse transcriptionnelle est insuffisante pour prévenir l'apparition de phénotype NTD chez ces embryons.

Le mécanisme précis par lequel cette vitamine agit pour corriger les NTD est mal connu. Des mutations de certaines enzymes impliquées dans le cycle du folate peuvent constituer un facteur de risque pour l'apparition des NTD chez l'homme, mais n'ont pas été identifiées comme cause directe de ces pathologies (Marco & Merello, 2006).

Un des mécanismes proposés de l'action du folate pour prévenir les NTDs est qu'il joue un rôle signalétique important au niveau du neurectoderme. La mégaline est fortement exprimée dans ces cellules et y joue deux rôles critiques : (1) elle serait responsable de l'absorption du folate de manière indépendante de SLC19A1 et de FBP1 dans le neurectoderme (Kur et al., 2014) et (2) sa présence est indispensable à l'internalisation et au trafic intracellulaire de Shh, lié à son récepteur Patched 1 (Christ et al., 2012). Par ailleurs, une carence en folate ou

l'inactivation de *Slc19a1* induisent toutes deux une diminution de l'expression des cibles en aval de la signalisation Shh (Ross, 2010; Toriyama et al., 2017). Il existerait donc un lien étroit entre la disponibilité du folate et l'activité du morphogène Shh.

Ainsi, il apparait que la disponibilité de certains nutriments constitue un facteur critique pour le bon déroulement de la neurulation.

b) Différents modes de nutrition de l'embryon

1) Placenta et nutrition hémotrophique

Il est largement connu que chez les mammifères, la nutrition du fœtus se fait essentiellement par l'intermédiaire du placenta, un organe spécialisé dans cette fonction. Ce mode de nutrition est dit « hémotrophique », c'est-à-dire par l'échange de nutriments entre les circulations maternelles et fœtales. La formation du placenta est un processus lent, qui débute au stade blastocyste avec la formation du trophectoderme, lequel se différencie pour donner les cellules géantes du trophoblaste, qui envahissent la décidue (issue de l'endométrium maternel) durant l'implantation de l'embryon (E5,5 chez la souris), et forment le cône ectoplacentaire. Plus tard (E8,5 chez la souris), la plaque chorionique se forme à partir du trophoblaste d'une part et de l'allantoïs (issue du mésoderme extra-embryonnaire) d'autre part. A partir de E9,5 les cellules géantes du trophoblaste remodèlent localement le réseau vasculaire maternel, tandis que l'angiogenèse dans l'allantoïde permet l'extension de la circulation sanguine embryonnaire jusque dans le chorion. Le trophoblaste forme un syncytium multinucléé, appelé syncytiotrophoblaste, vers E10,5 et cela marque le début des

échanges entre les circulations sanguines maternelle et embryonnaire (Woods, Perez-Garcia, & Hemberger, 2018). En effet, au niveau de cette couche cellulaire, l'espace entre les deux circulations est de 2 à 4 µm. Un grand nombre de transporteurs actifs de glucose et d'acides aminés essentiels y sont exprimés, facilitant l'import de nutriments par l'embryon (Gude, Roberts, Kalionis, & King, 2004). Les échanges entre la mère et l'embryon ne deviennent efficaces qu'autour de E11,5. Or, comme cela sera exposé dans la partie résultats, la fenêtre d'apparition du phénotype embryonnaire étudié dans cette thèse est plus précoce. Je vais donc décrire ci-après les mécanismes de nutrition de l'embryon indépendants du placenta.

2) L'autophagie dans le développement embryonnaire

L'autophagie joue un rôle critique pendant le développement embryonnaire. En effet, différentes études ont montré que la perte constitutive des protéines Atg5 et Atg7, essentielles pour l'autophagie, induisent une létalité embryonnaire précoce (Komatsu et al., 2005; Kuma et al., 2004). C'est aussi le cas avec d'autres protéines associées à l'autophagie (Muzushima and Levine, 2010). Par ailleurs, il a été rapporté qu'une carence en protéines subie transitoirement par la mère durant la période préimplantatoire induit des complications cardiovasculaires chez le nouveau-né (Flemming et al., 2017), ce qui suggère que la capacité de l'embryon à reposer sur l'autophagie est limitée. L'autophagie joue également un rôle crucial juste après la naissance, puisque le nouveau-né n'est plus nourri par l'intermédiaire du placenta et doit faire face à une carence nutritionnelle importante. Il se repose donc temporairement sur la dégradation de réserves internes, avant que l'allaitement ne prenne le relai.

c) La nutrition histiotrophique

Comme on vient de le voir, il existe chez les mammifères une fenêtre temporelle critique entre la période préimplantatoire et le moment où l'embryon peut se nourrir par l'intermédiaire du placenta (nutrition dite 'hémotrophique'). Pendant cette période critique (entre E5,5 et E10,5 environ chez la souris), il doit alors compter sur d'autres mécanismes pour subsister. Ainsi, la principale source de nutriments de l'embryon durant cette période est la nutrition dite 'histiotrophique'.

La nutrition histiotrophique est le mécanisme par lequel l'embryon obtient l'essentiel des nutriments nécessaires à son développement en dégradant des protéines sécrétées d'origine maternelle, entre la période péri-implantatoire et le moment où le placenta devient fonctionnel. Ce processus est peu étudié, bien qu'étant connu depuis longtemps (Beck, Swidzinska, & Gulamhusein, 1978). Compte tenu de son importance centrale dans la mise en place du phénotype embryonnaire décrit dans la partie résultat de ce manuscrit de thèse, il sera présenté en détail dans cette section.

1) Découverte de la nutrition histiotrophique

Ce mécanisme a été découvert par des tératologistes de la manière suivante : les travaux menés entre les années 60 et 80 par le professeur John Lloyd (entre autres), qu'il résume dans une revue (Lloyd, 1997), apportèrent les premières preuves de l'existence d'un mode de nutrition de l'embryon précoce jusque-là inconnu. A l'époque, l'étude des effets du bleu de

Trypan sur le développement embryonnaire révélèrent une propriété intéressante de cette molécule : contrairement aux autres agents tératogènes connus, le bleu de Trypan n'a d'effets tératogènes que pendant une fenêtre temporelle limitée de la gestation chez le rat. Or, ce colorant s'accumule dans le sac vitellin viscéral (dont le rôle sera détaillé plus loin), mais sans atteindre l'embryon. Il a donc été proposé que le bleu de Trypan perturbe une fonction à découvrir du sac vitellin. Des travaux ultérieurs ont montré que cette molécule s'accumulait dans les lysosomes des cellules endodermales du sac vitellin et qu'elle agissait comme un inhibiteur des hydrolases lysosomales dans ces cellules, empêchant la dégradation de protéines maternelles et l'apport d'acides aminés à l'embryon (Beck, Lloyd, & Griffiths, 1967).

Cet argument a été renforcé par des études complémentaires : des expériences d'incubation de conceptus de rat *ex vivo* avec des protéines radiomarquées permirent de confirmer que ces macromolécules s'accumulaient dans le sac vitellin, où elles étaient dégradées dans les lysosomes, puis que les acides aminés radiomarqués ainsi libérés étaient retrouvés au niveau de l'embryon lui-même (Freeman, Beck, & Lloyd, 1981). Par ailleurs, l'inhibition de la protéolyse lysosomale dans le sac vitellin par la leupeptine diminuait drastiquement la quantité d'acides aminés radioactifs retrouvés au niveau de l'embryon et induisait des effets tératogènes tels que l'anophtalmie et l'hydrocéphalie (Freeman & Lloyd, 1983). Ainsi, ces expériences furent les premières à mettre en évidence l'importance d'un mode de nutrition indépendant du placenta et se basant sur la fonction dégradative des lysosomes.

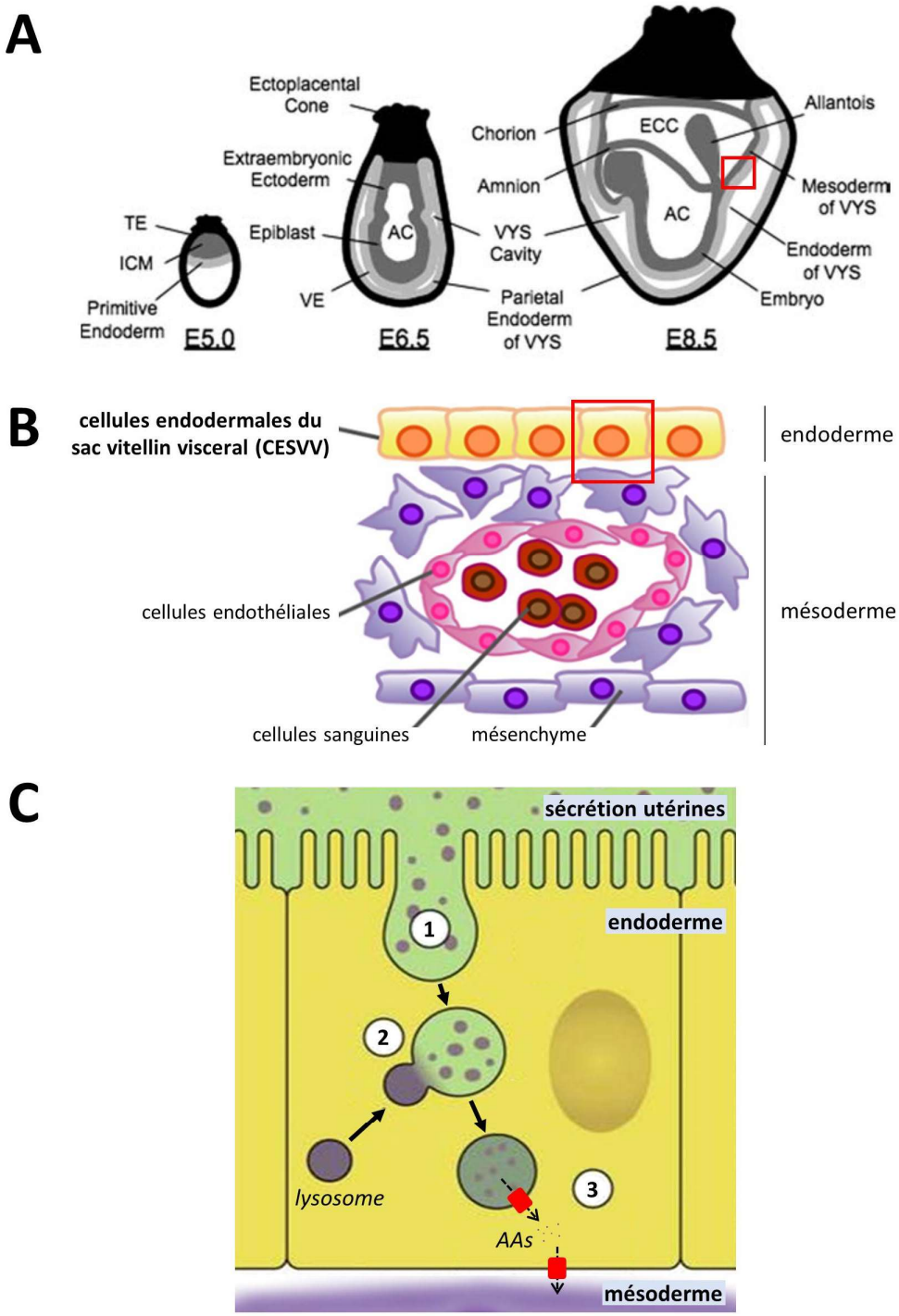


Figure 13 : Nutrition histiotrophique de l'embryon par le sac vitellin. **(A)** Dès le stade E8,5 chez la souris se forme un tissu extra-embryonnaire appelé sac vitellin viscéral (visceral yolk sac, VYS) qui entoure complètement l'embryon. Il a pour origine l'endoderme viscéral (VE) présent dès E6,5. **(B)** Zoom sur la zone encadrée en A détaillant la structure du sac vitellin, qui comprend une monocouche de cellules endodermales en dessous desquelles on trouve des cellules dérivées du mésoderme et la vascularisation primitive de ce tissu. **(C)** Zoom sur la zone encadrée en B, détaillant le fonctionnement d'une cellule endodermale du sac vitellin viscéral (CESVV) : (1) des protéines sécrétées par l'endométrium utérin sont massivement internalisées dans les CESVV, principalement par endocytose médiée par récepteurs mégaline-cubuline-amnionless ; (2) ces protéines vont être dégradées grâce à l'hydrolyse lysosomale, puis (3) les acides aminés (AAs) produits vont être exportés par des transporteurs et finalement rejoindre l'embryon.

Autres abréviations : TE = trophectoderme ; ICM = inner cell mass ; AC = cavité amniotique ; ECC = cavité exocoelomique

Adapté de Zohn & Sarkar, Birth Defects Research 2010 ; Oka et al., JCS 2017 ; Cindrova-Davies et al., PNAS 2017

2) Mécanisme de la nutrition histiotrophique

2.1) Formation du sac vitellin, tissu effecteur de la nutrition histiotrophique

Juste avant l'implantation (E5,5 chez la souris), la masse cellulaire interne du blastocyste forme d'une part l'épiblaste, qui donnera lieu à l'embryon lui-même, et d'autre part l'hypoblaste qui formera des structures extra-embryonnaires. A E6,5 l'hypoblaste se différencie soit en endoderme pariétal, soit en endoderme viscéral (EV). Puis, entre E7,5 et E8,5, l'EV contribue à former un tissu appelé sac vitellin viscéral (SVV) (voir figure 13 A). Le SSV comprend deux types cellulaires principaux : une couche d'origine mésodermale, à laquelle est superposée une couche de cellules endodermales issues de l'EV (cellules endodermales du sac vitellin viscéral, CESVV) (figure 13 B). Ces CESVV font face à la paroi utérine (figure 14). Ce sont des cellules polarisées : on retrouve le noyau au pôle basal, alors que le pôle apical présente un grand nombre de microvillosités et de vésicules d'endocytose (Zohn & Sarkar, 2010). Il a été démontré que ce sont les CESVV (et l'EV avant E7,5) qui jouent un rôle crucial dans la fonction de nutrition histiotrophique (W. S. Chen et al., 1994; Duncan et al., 1994). Elles constituent un épithélium absorptif monocouche dans le SVV.

2.2) Internalisation de sécrétions maternelles dans le sac vitellin

Ces cellules internalisent massivement des macromolécules sécrétées par l'endométrium utérin, principalement par endocytose médiée par un récepteur. Le récepteur prépondérant dans les CESVV est le complexe multiligand mégaline-cubiline-amnionless. En réalité ce complexe n'est pas systématiquement constitué de ces trois protéines, sa composition

dépend de la nature du ligand (Nielsen, Christensen, & Birn, 2016). Il participe à l'internalisation de nombreuses protéines et lipides, ainsi que de vitamines telles que l'acide folique, l'acide rétinoïque, la cobalamine et l'ascorbate (Amsellem et al., 2010; Kozyraki & Gofflot, 2007). Les KO de *Lrp2, Cubn* ou *Amn* (les gènes codant pour la mégaline, la cubiline et amnionless, respectivement) induisent chacun une létalité embryonnaire associée à des défauts du tube neural chez la souris (Kalantry et al., 2001; Smith et al., 2006; Willnow et al., 1996), ce qui souligne l'importance du récepteur tripartite pour le développement de l'embryon durant la neurulation. L'internalisation du récepteur accompagné de son ligand dans une vésicule d'endocytose dépend de son interaction avec un manteau de clathrines, un phénomène contrôlé par la protéine adaptatrice Disabled-2 (Dab2). Là aussi, la fonction de cette dernière protéine est critique puisque que le KO de *Dab2* chez la souris induit une létalité embryonnaire précoce (Morris, 2002).

Ainsi, le complexe multiligand mégaline-cubiline-amnionless constitue la principale voie d'entrée des sécrétions maternelles au pôle apical des CESVV (et des cellules de l'EV avant E7,5). On mentionnera tout de même le rôle parallèle de la transferrine et de son récepteur dans l'internalisation du fer, essentiel pour l'hématopoïèse (Young, Klemm, Beckman, Brent, & Lloyd, 1997). En outre, dans le cas de l'acide folique, qui est particulièrement critique pour le bon déroulement de la neurulation, il n'est pas surprenant de voir qu'il existe une voie supplémentaire d'entrée pour cette vitamine : le transporteur SLC19A1.

2.3) Voie d'endocytose dans le sac vitellin : cas particulier des vacuoles apicales des cellules endodermales

La voie d'endocytose dans les CESVV ne présente pas les mêmes caractéristiques que dans la majorité des types cellulaires. Notamment, bien que des lysosomes soient présents, ces cellules possèdent en plus de larges structures particulières appelées vacuoles apicales (par analogie avec les vacuoles des levures) (King & Enders, 1970; Lambson, 1966). Ces vacuoles présentent des caractéristiques endo-lysosomales telles que la présence des marqueurs LAMP1, LAMP2 et syntaxine 7 à leurs membranes ainsi qu'un contenu riche en enzymes hydrolytiques. Si les voies contrôlant leur biogenèse sont méconnues, on sait cependant que leur formation nécessite la production d'acide lysophosphatidique par l'autotaxine, et que ce lipide influence des réarrangements du cytosquelette d'actine à proximité de ces vacuoles, et leur fusion homotypique (Koike et al., 2009). La perte du gène codant pour l'autotaxine induit un retard développemental et des défauts céphaliques (Koike, Keino-Masu, & Masu, 2010).

Outre leur grande taille (1 à 3 µm de diamètre), une autre particularité des vacuoles apicales réside dans le mécanisme original par lequel elles reçoivent le matériel à dégrader. En effet, contrairement aux lysosomes dont le contenu fusionne avec celui des endosomes après fusion de leurs membranes, les vacuoles apicales internalisent les endosomes dans leur lumière par le biais d'un processus dépendant de Rab7 (figure 15 B) ressemblant à de la microautophagie (figure 15 A). Puis, la double membrane des endosomes internalisés est lysée par des lipases dans la lumière des vacuoles apicales (Kawamura et al., 2012) (voir modèle proposé en figure 15 C).

Ainsi, les CESVV internalisent par endocytose, puis par un processus semblable à la microautophagie, des protéines sécrétées par l'endométrium, ces sécrétions étant ensuite

dégradées dans les vacuoles apicales. La biologie de ces vacuoles reste encore largement méconnue. Notamment, on connait mal leur devenir, par exemple si elles entrent en jeu dans des phénomènes d'exocytose ou de fission.

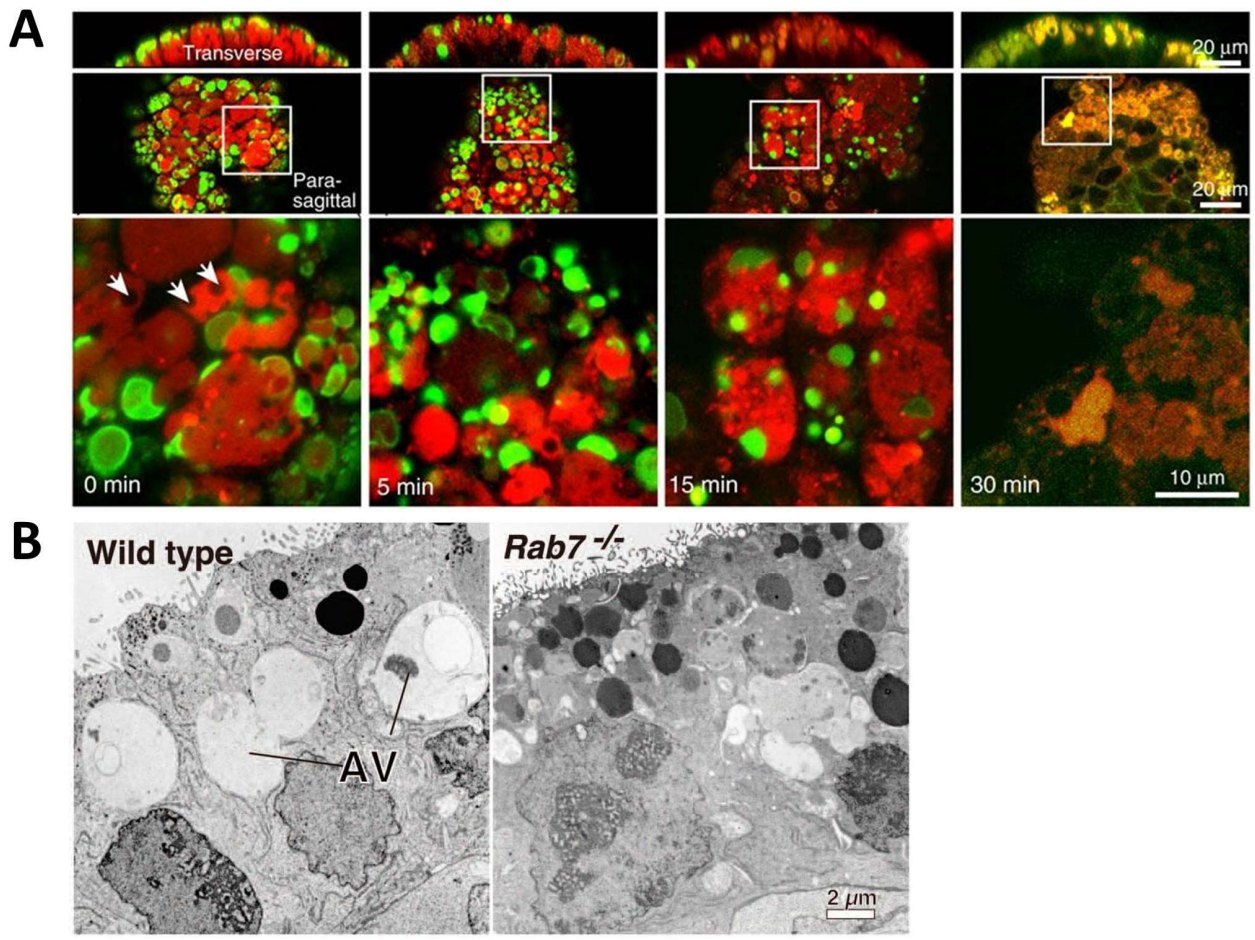


Figure 15 : Voie d'endocytose dans les cellules de l'endoderme viscéral murin à E6,5. Ces images sont issues des travaux du groupe de Yoh Wada. **(A)** Marquage des vacuoles avec un dextran couplé à un fluorochrome rouge; suivi d'un pulse avec un dextran couplé à un fluorochrome vert avec différents temps de chasse. On voit à 15 min la présence de vésicules intraluminales vertes dans ces vacuoles, puis coalescence des deux fluorochromes à 30 min. **(B)** Images obtenues en microscopie électronique montrant les vacuoles apicales (AV) dans ces cellules, dont la formation nécessite l'activité de Rab7. **(C)** Modèle proposé de la voie d'endocytose dans l'endoderme viscéral murin.
(A) & (C) adapté de Kawamura et al., Nat. Com. 2012 ;
(B) adapté de Yoh Wada, BioArchitecture 2013

Les nutriments (acides aminés, etc.) ainsi produits dans les vacuoles apicales sont exportés vers le cytosol, puis l'efflux basolatéral les redirige vers le mésoderme extra-embryonnaire du sac vitellin. Comme détaillé plus loin, ces cellules mésodermales vont réaliser les premiers évènements d'hématopoïèse et d'angiogenèse, et la circulation sanguine vitelline permettra le transport des nutriments jusqu'à l'embryon.

En résumé, la nutrition histiotrophique consiste en l'internalisation soutenue de diverses macromolécules d'origine maternelle dans les CESVV (et dans l'EV à un stade plus précoce) par endocytose médiée par un récepteur suivie d'un processus similaire à la microautophagie, puis en la dégradation de ces macromolécules dans les vacuoles apicales et les lysosomes, et enfin un transport des nutriments nouvellement formés jusqu'à l'embryon en plusieurs étapes (efflux lysosomal, efflux basolatéral puis circulation vitelline) (figure 13 C).

On notera que les CESVV/EV sont également impliquées dans d'autres fonctions comme la signalisation transcellulaire via l'internalisation de cytokines d'origine maternelle (Wada, Sun-Wada, & Kawamura, 2013) ou encore la cardiogénèse (Wallingford & Giachelli, 2014), mais ces fonctions ne seront pas détaillées ici.

3) Pertinence de la nutrition histiotrophique chez l'humain

Le sac vitellin est présent chez l'embryon humain, mais sa morphologie diffère fortement de celle des embryons de rongeurs. En effet, chez la souris et le rat, le sac vitellin se développe de sorte qu'il recouvre entièrement l'embryon (figure 14 A), on parle d'ailleurs de sac vitellin 'inversé'. Les CESVV occupent une superficie importante et font directement face à l'endométrium, facilitant ainsi l'accès aux sécrétions (figure 14 B). En revanche chez l'humain,

le sac vitellin est plus petit et n'enveloppe pas l'embryon. Il prend la forme d'une 'poche' rattachée au niveau ventral (figure 14 A). Cette organisation anatomique a longtemps été considérée comme le signe d'un rôle vestigial du sac vitellin dans la nutrition de l'embryon humain. Cependant, différentes approches expérimentales, notamment celles du groupe de Graham Burton à Cambridge, ont remis en question cette thèse et montré le rôle essentiel du sac vitellin au cours du premier trimestre de gestation.

Bien que le processus de nutrition histiotrophique soit plus complexe chez l'homme que chez les rongeurs (Cindrova-Davies et al., 2017), on retrouve chez ces espèces une organisation tissulaire du sac vitellin très proche : des CESVV avec des microvillosités et une vascularisation précoce de la couche mésodermale permettant le transport des nutriments (Pereda T. & Motta, 1999). De plus, l'endométrium utérin sécrète activement des protéines et carbohydrates, et le suivi du devenir de ces molécules révèle qu'on les retrouve dans l'espace intervilleux d'abord, puis dans le sac vitellin, indiquant que les CESVV ont bien accès aux sécrétions maternelles en dépit de leur localisation (Burton, Hempstock, & Jauniaux, 2001).

Une autre ligne d'arguments supportant l'importance de la nutrition histiotrophique chez l'homme est la fenêtre temporelle de la transition entre les nutritions histiotrophique (sac vitellin) et hémotrophique (placenta). En effet, si l'implantation de l'embryon a lieu dès 2 semaines de grossesse, en revanche les premiers échanges notables entre la circulation maternelle et la circulation fœtale n'ont lieu qu'à partir de 10 à 12 semaines de grossesse chez l'humain (E. Jauniaux, Jurkovic, & Campbell, 1995). L'initiation de ces échanges est directement visualisable en suivant les variation de niveaux de dioxygène, qui augmentent fortement avec l'établissement de la connexion placentaire aussi bien chez l'humain que chez la souris (Eric Jauniaux et al., 2000; Ufer, 2011). Cela signifie qu'entre la deuxième et la dixième

semaine de grossesse, l'embryon ne peut pas se procurer de nutriments via les échanges placentaires, ce qui implique l'utilisation d'un autre processus de nutrition.

En outre, la vascularisation du sac vitellin se produit beaucoup plus précocement que l'établissement des échanges placentaires (Garcia & Larina, 2014). En effet, dès la formation du mésoderme lors de la gastrulation, un certain nombre de cellules de ce feuillet sont déterminées par des facteurs diffusibles de la famille des FGF (fibroblast growth factors) et des VEGF (vascular endothelial growth factor) et seront alors destinées à devenir des hémangioblastes. Ces cellules situées dans la couche mésodermale du sac vitellin viscéral vont alors se différencier soit en angioblastes puis en cellules de l'endothélium vasculaire, soit en précurseurs de la lignée hématopoïétique puis en cellules sanguines (Risau & Flamme, 1995). Ces cellules sont organisées en clusters appelés ilots d'hématopoïèse. Ce phénomène se produit dès E7.5, mais à ce stade les cellules ont encore un potentiel prolifératif limité ; ce n'est qu'à partir de E9.5 qu'elles deviennent capable de former des colonies sur le long terme (Schuh et al., 2004). La mise en place de cette circulation vitelline est cruciale pour l'acheminement des nutriments produits par le sac vitellin jusqu'à l'embryon.

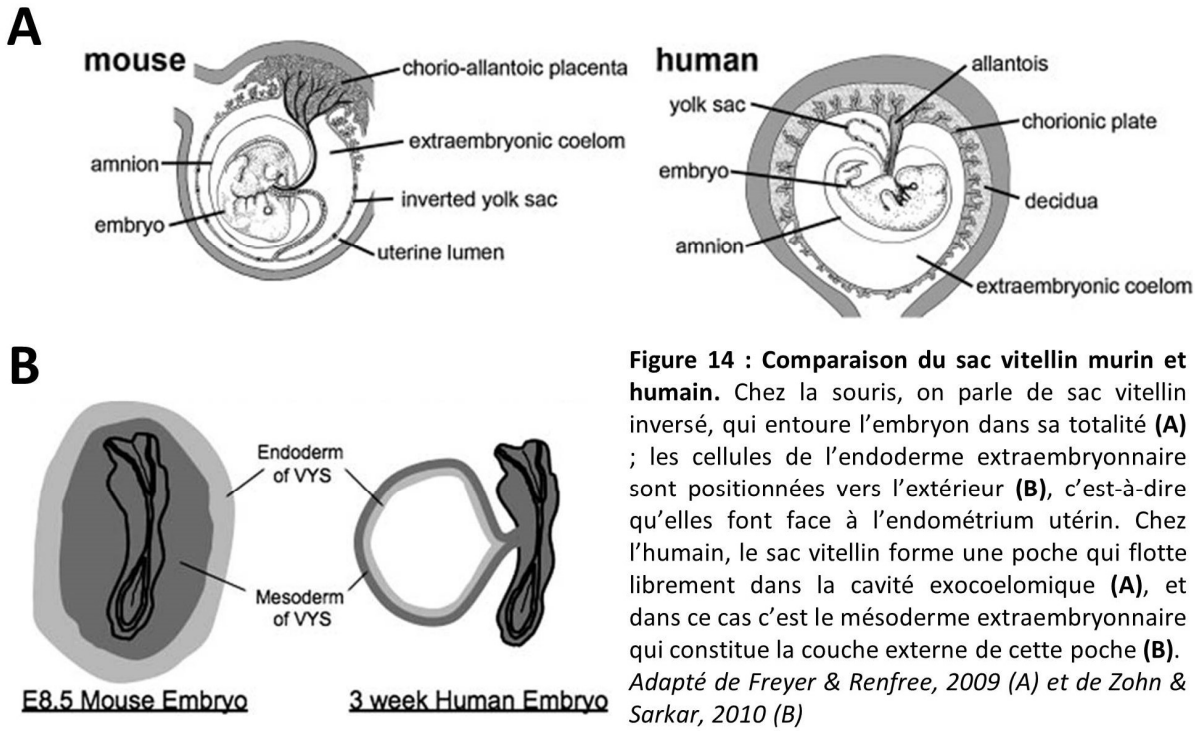


Figure 14 : Comparaison du sac vitellin murin et humain. Chez la souris, on parle de sac vitellin inversé, qui entoure l'embryon dans sa totalité **(A)** ; les cellules de l'endoderme extraembryonnaire sont positionnées vers l'extérieur **(B)**, c'est-à-dire qu'elles font face à l'endométrium utérin. Chez l'humain, le sac vitellin forme une poche qui flotte librement dans la cavité exocoelomique **(A)**, et dans ce cas c'est le mésoderme extraembryonnaire qui constitue la couche externe de cette poche **(B)**. *Adapté de Freyer & Renfree, 2009 (A) et de Zohn & Sarkar, 2010 (B)*

L'organisation du sac vitellin chez le lapin se rapproche plus de celle observée chez l'humain par rapport au rat. Un autre groupe s'est attaché à comparer l'impact de la fonction histiotrophique sur le développement d'embryons de rat et de lapin, et plus précisément les effets tératogènes induits par son blocage. L'inhibition de la protéolyse lysosomale, mais aussi de l'endocytose médiée par le récepteur cubiline, induit des effets tératogènes et/ou de retard développemental chez le lapin, comme chez le rat, bien que ces effets tératogènes soient de natures et d'intensités différentes entre les deux espèces. Cela suggère là encore que la protéolyse lysosomale dans le sac vitellin remplit une fonction vitale également chez le lapin (Marshall et al., 2015).

Enfin, une étude récente (Cindrova-Davies et al., 2017) a permis de mettre en évidence une conservation du transcriptome entre les sacs vitellins humains et murins. En dehors du rôle désormais bien connu du sac vitellin humain dans l'hématopoïèse, les auteurs se sont aussi intéressés à l'expression des transporteurs de métabolites dans ce tissu, ces derniers étant

indispensables dans le processus de nutrition histiotrophique pour acheminer les nutriments nouvellement produits jusqu'à la circulation vitelline. Ces travaux montrent que parmi les transcrits du sac vitellin les plus abondants chez les deux espèces, on retrouve des transporteurs membranaires (principalement des familles de SLC), des enzymes lysosomales, et des protéines impliquées dans le métabolisme et le transport des lipides. Chez l'humain, le mécanisme de la fonction histiotrophique est plus complexe que chez la souris puisqu'il ferait intervenir plusieurs types cellulaires, les auteurs n'excluant pas que la protéolyse lysosomale puisse intervenir au moins en partie dans les cellules mésodermales. Cependant et malgré les différences mécanistiques et morphologiques entre l'humain et la souris, ces données moléculaires renforcent l'idée d'une conservation de la fonction de nutrition histiotrophique pour la nutrition précoce de l'embryon chez ces deux espèces.

d) Comparaison avec d'autres épithéliums absorptifs de protéines

1) Le tubule proximal rénal et le syndrome de Fanconi

La nature d'épithélium absorptif de protéines du sac vitellin n'est bien sûr pas exclusive de ce tissu. Notamment, on retrouve des propriétés très similaires dans le tubule contourné proximal (TCP) du rein, un épithélium jouant un rôle clé dans la réabsorption par endocytose de vitamines et de protéines. Cette similitude est particulièrement intéressante dans le cadre de cette étude puisque ce tissu est le premier à être affecté dans la cystinose. En effet, elle se manifeste par une défaillance rénale, qui est létale si elle n'est pas traitée.

1.1) Biologie des tubules contournés proximaux du rein

Diverses pathologies impactant l'endocytose dans les TCP sont associées à une protéinurie et une albuminurie chez les patients : par exemple la maladie de Dent associée à des mutations de l'échangeur chlore/proton CLC-5 (Piwon, Günther, Schwake, Bösl, & Jentsch, 2000), ou encore des défauts de l'échangeur sodium/proton NHE3 impliqué entre autres dans la néphropathie diabétique et l'hypertension (Gekle et al., 2004; Girardi & Di Sole, 2012). Le principal mécanisme intervenant pour l'endocytose des protéines dans ces cellules est, comme dans le sac vitellin, l'endocytose médiée par le récepteur mégaline-cubiline-amnionless (Dickson, Wagner, Sandoval, & Molitoris, 2014). Là aussi, chez l'homme comme chez la souris, la perte de fonction de la cubiline conduit à un défaut prononcé de réabsorption rénale de l'albumine (Amsellem et al., 2010; Storm et al., 2011).

La réabsorption des protéines de bas poids moléculaire est une fonction absolument essentielle du rein : en effet, un défaut de cette fonction conduit à une protéinurie, laquelle a pour conséquence une aggravation encore plus importante de la fonction des TCP. Notamment, il a été montré qu'une quantité trop importante d'albumine dans l'urine, comme c'est le cas lors d'une protéinurie, conduit à une activation prononcée et prolongée du complexe mTORC1, laquelle induit à son tour une inhibition de l'autophagie (Nolin et al., 2016). Cette inactivation chronique de l'autophagie est, sur le long terme, délétère pour les cellules des TCP, ce qui ajoute une strate de complexité à la physiopathologie rénale mais pourrait aussi constituer une cible pharmacologique intéressante.

L'albumine se lie aussi à un autre récepteur dans les cellules du TCP, le neonatal Fragment crystallizable Receptor (FcRn). Ce dernier ne permet pas l'acheminement de l'albumine jusqu'à des compartiments dégradatifs, mais permet au contraire sa transcytose, c'est-à-dire

son transport jusqu'aux régions basolatérales de la cellule, grâce à un mécanisme original. L'albumine lie préférentiellement la cubiline à pH neutre. Après son internalisation, la maturation de l'endosome s'accompagne d'une baisse du pH de sa lumière, causant ainsi la dissociation de l'albumine et de la cubiline (cette dernière est ensuite recyclée). Or, à pH acide, l'affinité de FcRn pour l'albumine augmente, ce qui lui permet de lier une partie de la protéine libérée. L'albumine libre est donc majoritairement envoyée au lysosome, mais pas celle liée à FcRn. Suite à la fusion du compartiment endosomal avec la membrane basolatérale, le pH augmente, ce qui induit la libération de l'albumine, et sa diffusion vers la circulation sanguine (Tenten et al., 2013). Ce récepteur est d'ailleurs connu pour son rôle dans la transcytose des immunoglobulines maternelles dans le placenta durant le développement embryonnaire, d'où son nom. Il est donc logique de le retrouver ici dans un rôle de récupération par transcytose de la protéine circulante la plus commune.

A l'instar des autres types cellulaires, l'internalisation du récepteur et de sa cible nécessite le recrutement d'un manteau de clathrines et l'invagination de la membrane. L'interaction entre le complexe mégaline-cubiline et le manteau de clathrine nécessite l'intervention d'une protéine adaptatrice, Disabled-2 (Dab2) (Oleinikov, Zhao, & Makker, 2000) comme dans le sac vitellin (Morris, 2002). Une fois l'internalisation effectuée, le cargo est acheminé par le biais de tubules apicaux vers de larges vacuoles endocytaires (Hatae, Ichimura, Ishida, & Sakurai, 1997), qui constituent le carrefour à partir duquel les protéines membranaires sont orientées soit vers la dégradation soit vers le recyclage. Dans les cellules tubulaires proximales cependant, cette dernière voie est favorisée car plus rapide, ce qui est cohérent avec leur fonction qui nécessite une expression forte de récepteurs tels que la mégaline, afin de constamment réabsorber les protéines.

1.2) Le syndrome de Fanconi

Comme mentionné dans la première partie de cette introduction, une pathologie rénale particulièrement pertinente dans le cadre de notre étude est le syndrome de Fanconi dont souffrent les patients cystinotiques (la cystinose étant la première cause génétique de ce syndrome). Chez les patients cystinotiques, les cellules du TCP montrent un taux d'apoptose anormalement élevé, possiblement en raison d'une une susceptibilité accrue au stress oxydant et de l'expression accrue de certaines caspases (Galarreta et al., 2015; Sansanwal, Kambham, & Sarwal, 2010). Cependant, le lien entre stress oxydant et syndrome de Fanconi reste ouvert au débat. En effet, si il est clair que l'absence d'export de cystine lysosomale dans la cystinose perturbe l'état redox du glutathion (voir première partie de l'introduction ; (Chol, Nevo, Cherqui, Antignac, & Rustin, 2004; Levtchenko et al., 2005)), l'apparente inefficacité de la cystéamine vis-à-vis du syndrome de Fanconi établi (Baum, 1998) tend à indiquer que la pathologie n'est pas une conséquence directe d'une baisse de la protection antioxydante. Un autre exemple est celui d'une étude récente (Lobry et al., 2019) qui met en évidence un rôle de l'inflammation dans le syndrome de Fanconi des patients cystinotiques : la perte de la cystinosine entrainerait une surexpression de la Galectine 3, laquelle contribuerait au recrutement de monocytes et à la mise en place d'une inflammation chronique des reins.

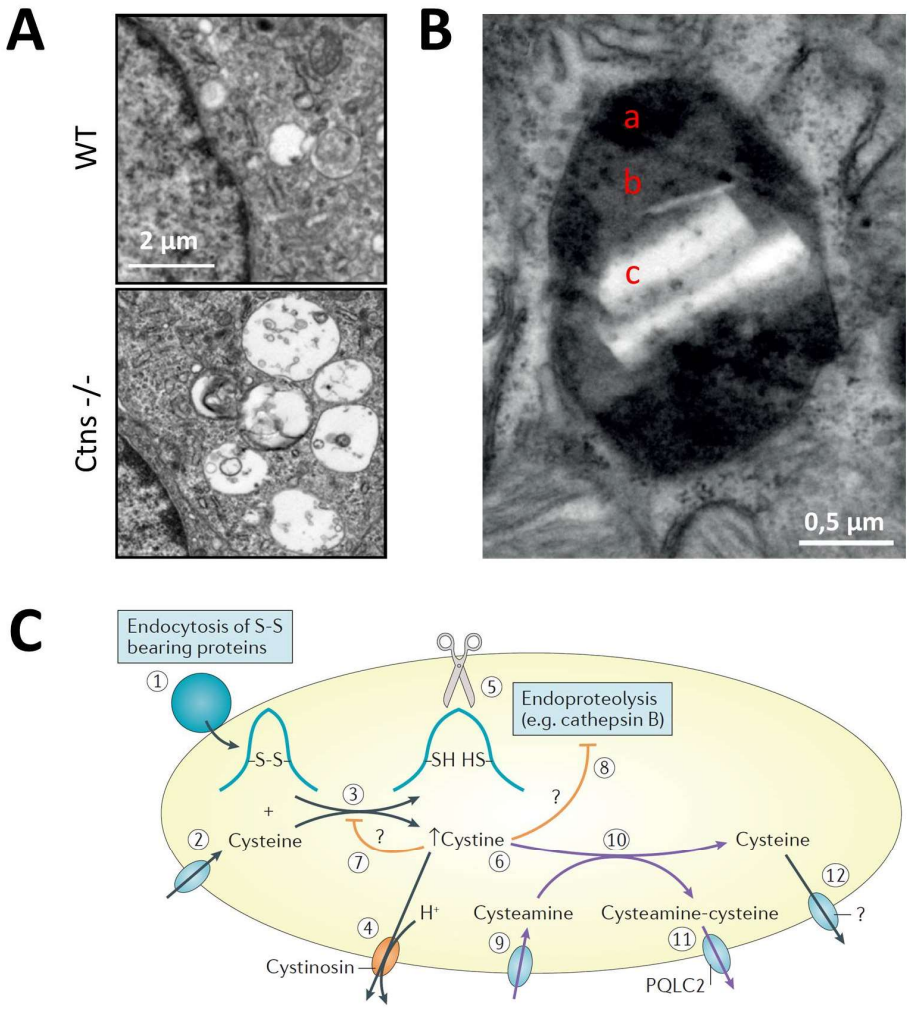


Figure 16 : Défaut de protéolyse lysosomale dans le syndrome de Fanconi induit par la cystinose. **(A)** Visualisation en microscopie électronique de vacuoles autophagiques élargies et sur-représentées dans des cellules de tubule proximal murin cystinotiques *in vitro* par rapport au WT. **(B)** Microscopie électronique d'un lysosome d'une cellule du tubule proximal de rein de souris cystinotique, permettant de visualiser d'une part une accumulation de protéines non dégradées définissant une zone moins dense aux électrons (b) par rapport au reste de la lumière lysosomale (a), et d'autre par des cristaux de cystine (c) caractéristiques de cette maladie. **(C)** Bases biochimiques putatives du défaut de protéolyse lysosomale dans la cystinose.
Adapté de Cherqui & Courtoy, Nature Reviews 2017 ; Festa et al., Nature Communications 2018

De manière intéressante, la cystinose induit aussi dans les TCP un défaut de recyclage du récepteur mégaline-cubuline et de l'endocytose médiée par ce récepteur (Chevronnay et al., 2014; Ivanova et al., 2015) ainsi que l'apparition de compartiments endolysosomaux élargis et retenus dans l'espace périnucléaire (Raggi et al., 2014). La cystinosine pourrait donc avoir un rôle régulateur dans la voie d'endocytose. Deux études récentes soutiennent cette idée.

(1) L'étude par (Festa et al., 2018) indique que les cellules de TCP cystinotiques montrent une plus grande quantité d'agrégats positifs pour p62 et d'autophagosomes positifs pour LC3 en raison d'un défaut de clairance. Les auteurs font le lien entre ce défaut d'autophagie et la translocation nucléaire de ZONAB (ZO-1 associated Y-box factor), un facteur de transcription qui réprime l'expression de *Lrp2*, le gène codant pour la mégaline. (2) Un autre article par (Zhang et al., 2017) met en évidence le rôle de la cystinosine dans l'autophagie médiée par des chaperons en montrant, d'une part, que le transporteur, mais pas son activité de transport, est nécessaire à la bonne localisation du récepteur de ce type d'autophagie, LAMP2A, et d'autre part, que le contrôle de la localisation de LAMP2A par la cystinosine fait intervenir Rab 11 et RILP (un effecteur de Rab 7).

Enfin, un dernier point qu'il est important de prendre en compte pour bien appréhender ce rôle particulier de la cystinosine est le fait qu'on observe des défauts de protéolyse lysosomale importants dans le syndrome de Fanconi des patients cystinotiques (voir figure 16 A et B). Une explication biochimique possible de ce phénomène serait que l'accumulation de cystine dans les lysosomes conduise à un changement de l'état rédox de leur contenu, qui deviendrait alors plus oxydant. Cela aurait pour conséquence d'inhiber la réduction des ponts disulfure des protéines internalisées dans la lumière, et donc de limiter leur exposition aux protéases lysosomales, donc leur dégradation (Stephanie Cherqui & Courtoy, 2017) (figure 16 C).

Par ailleurs, la cystinosine interagit physiquement avec la v-ATPase et avec le complexe Rag-Ragulator, ce qui lui permet de participer à la régulation de l'activation de mTORC1 en réponse aux acides aminés (Andrzejewska et al., 2016). Ce mécanisme est cohérent avec l'observation d'une perturbation importante de la dynamique d'activation de ce complexe chez les patients cystinotiques (Ivanova et al., 2016). Compte tenu du rôle central de mTORC1 dans

l'autophagie et la régulation du flux lysosomal, il est possible que sa dérégulation soit en amont des défauts de la fonction lysosomale. Cette idée est renforcée par le fait que la surexpression de TFEB (donc le contournement de la régulation négative de mTORC1 sur la biogenèse lysosomale) permet de réduire l'accumulation de cystine (Rega et al., 2016).

En résumé, il est très intéressant dans le cadre de notre problématique de faire le parallèle entre les cellules endodermales du sac vitellin viscéral et les cellules des tubules proximaux des reins en raison des nombreuses propriétés biologiques communes, à la fois dans leur structure et dans leur fonction. En particulier, l'organisation particulière de la machinerie d'endocytose de ces cellules constitue un point d'entrée intéressant pour comprendre la place et le rôle de certaines protéines dans cette voie, en particulier celles plus difficilement accessibles comme la cystinosine et PQLC2. La limite que l'on pourrait objecter à la mise en parallèle de ces deux types cellulaires est le manque de comparaisons quantitatives du devenir des protéines internalisées

En effet, on sait que le rôle principal du sac vitellin est de dégrader les macromolécules pour nourrir l'embryon, mais on sait aussi que ces cellules effectuent la transcytose d'immunoglobulines maternelles (A. E. Wild, Lloyd, & Hemmings, 1975) et probablement d'autres protéines circulantes compte tenu du rôle hématopoïétique du sac vitellin. Les cellules des tubules proximaux favorisent la recapture et le recyclage de certaines protéines excrétées, mais le poids relatif de la protéolyse lysosomale par rapport à la transcytose n'est pas bien documenté.

2) Autres épithéliums

Un autre type cellulaire qui vient immédiatement à l'esprit lorsque l'on parle de barrière absorptive sont les entérocytes de l'intestin grêle, un lieu majeur d'absorption des nutriments issus de la digestion. La principale différence dans ce cas est que la dégradation des macromolécules se fait dans le tractus digestif et non à l'intérieur de la cellule, les entérocytes n'absorbant que des molécules simples (monosaccharides, acides gras, acides aminés…). Cependant, il existe une exception à cette règle : en effet, chez les nouveaux nés (humains et murins), les entérocytes possèdent encore la capacité d'internaliser des protéines non digérées. Cette capacité est d'une importance cruciale puisqu'elle permet l'absorption d'immunoglobulines maternelles sécrétées dans le lait et joue un rôle immunoprotecteur.

L'endocytose médiée par la mégaline remplit une fonction importante pour la sécrétion d'hormones thyroïdiennes. En effet, elle est exprimée au pôle apical des thyrocytes (qui constituent un épithélium monostratifié dans les follicules) et est responsable de l'endocytose de la pro-hormone thyroglobuline. Celle-ci est ensuite clivée dans les lysosomes pour libérer les hormones T3 et T4. La mégaline fait partie intégrante du mécanisme de régulation de la sécrétion hormonale puisque son expression dans les thyrocytes (et donc la capacité de ces cellules à cliver la thyroglobuline) est directement modulée par la thyréostimuline. On notera aussi que la mégaline joue un rôle de senseur des niveaux extracellulaires de calcium au niveau des glandes parathyroïdiennes, modulant ainsi leur capacité à sécréter la parathormone (Fisher & Howie, 2006).

Enfin, on retrouve également la mégaline (ainsi que d'autres récepteurs aux LDLs) dans la barrière hémato-encéphalique et dans le système nerveux central. Elle y joue un rôle

important dans le métabolisme du cholestérol, par l'intermédiaire des lipoprotéines Apo-E et Apo-J (Gosselet et al., 2009; Pietrzik & Jaeger, 2008).

L'épithélium pigmentaire rétinien (EPR), qui consiste en une monocouche de cellules situées sous les cellules photoréceptrices de la rétine, est également un épithélium absorptif. L'un de ses rôles est de participer au renouvellement de la membrane des cellules photoréceptrices, en phagocytant ses composants. L'inactivation conditionnelle de *Lrp2* chez la souris induit une hypertrophie oculaire et une myopie (Cases et al., 2015). Ce phénotype est associé à une élévation des protéines totales, et en particulier de ligands de la mégaline comme l'albumine, dans le corps vitreux de l'œil (Cases et al., 2017).

C) PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS DE LA THESE

Cette thèse vise à étudier l'implication de la cystinosine et de PQLC2 dans le développement embryonnaire murin, et se base sur des résultats antérieurs du laboratoire, présentés ici.

a) Données antérieures du laboratoire

1) Création du modèle murin Pqlc2 KO

Avant le début de cette thèse, mon laboratoire d'accueil a produit un modèle murin constitutivement déficient pour *Pqlc2* en collaboration avec le programme de l'UC Davis Mouse Biology. Ce modèle a été caractérisé par les docteurs Xavier Leray et Seana O'Regan. L'approche utilisée consistait à introduire une cassette de délétion dans des cellules souches embryonnaires de souris de fond C57BL/6N, puis à injecter ces cellules dans des blastocystes de souris de fond BALB/c. Les souris chimériques ainsi obtenues ont été croisées au laboratoire avec des souris C57BL/6N jusqu'à obtenir une population porteuse de l'allèle mutée sur ce fond génétique. L'équipe a donc généré des souris hétérozygotes, puis homozygotes *Pqlc2* -/- (désignées ci-après comme *Pqlc2* KO) sur fond génétique C57BL/6N.

Xavier et Seana ont pu mettre en évidence que les souris *Pqlc2* KO sont viables et fertiles. Elles ont une croissance et longévité normale et ne présentent pas de morbidité visible. Elles n'ont pas non plus d'anomalies évidentes de comportement (agressivité etc.). Avec l'aide du docteur Bruno Saubaméa, l'équipe avait effectué une caractérisation morphologique à l'échelle tissulaire et subcellulaire de différents organes (foie, rate, muscle squelettique,

cervelet, œil) de souris *Pqlc2* KO et sauvages (WT). L'analyse en microscopie optique des tissus n'avait révélé aucune anomalie morphologique chez les animaux KO, et la microscopie électronique n'avait pas permis de détecter la présence de lysosomes élargis, qui sont fréquemment retrouvés dans les maladies de surcharge lysosomale. Enfin, les acides aminés plasmatiques de souris mises à jeun ou non avaient été dosés dans le but de détecter un éventuel impact de l'absence de *Pqlc2* sur les taux d'acides aminés cationiques circulants lors d'une carence nutritionnelle. Cette expérience n'avait pas non plus démontré de différence entre les animaux KO et WT. Ainsi cette première analyse semblait indiquer une absence de phénotype chez cette lignée murine KO. Si *Pqlc2* participe à une fonction cellulaire essentielle, son absence est certainement compensée par d'autres voies. La transmission génétique de la mutation dans des croisements entre hétérozygotes suit les proportions mendéliennes. On notera tout de même qu'une analyse du sex-ratio montre une proportion de mâles *Pqlc2* KO significativement diminuée par rapport aux WT.

2) Découverte de la létalité synthétique du double KO de Pqlc2 et Ctns

Les expériences mettant en évidence l'importance de PQLC2 pour le traitement de la cystinose par la cystéamine publiées précédemment par l'équipe (Jézégou et al., 2012) présentaient deux limites : (1) le modèle biologique utilisé étant des cultures de cellules de patients cystinotiques, il pose le problème de la représentativité de toute expérience faite *in vitro* ; (2) *Pqlc2* n'est pas complètement absent dans ces expériences, puisqu'il s'agit d'une réduction de l'expression du gène (knock down, KD) de la protéine, et non d'un KO. L'approche proposée par l'équipe pour contourner ces limitations consistait à générer une lignée murine doublement KO (DKO) pour les deux transporteurs. Des souris *Ctns* KO ont donc été croisées

avec des souris *Pqlc2* KO, et les portées résultantes de doubles hétérozygotes (*Ctns +/- ; Pqlc2 +/-)* ont été croisées entre elles pour générer des souris DKO.

Après avoir génotypé plusieurs portées, une anomalie est apparue évidente : il n'y avait aucune naissance de souris DKO (figure 17). Afin d'identifier la cause de ce phénomène, et notamment pour discriminer si la perte de viabilité se produisait au niveau gamétique ou embryonnaire, Xavier a effectué des croisements susceptibles de générer des animaux DKO et extrait l'utérus de femelles gravides au stade E 12,5 de gestation. Ces expériences, qui arrivèrent en conclusion de sa thèse, permirent d'affirmer que des embryons DKO étaient bel et bien présents durant la gestation. L'analyse des tableaux de transmission génétique des mutations suggérait une létalité embryonnaire, et la présence de ces embryons l'a confirmé. Les embryons DKO présentaient des anomalies morphologiques fortes au niveau de la tête. Une autre observation intéressante (qui sera développée plus avant dans cette thèse) faite par Xavier est celle d'un effet de dose des allèles mutés. En effet, les génotypes trialléliques, c'est-à-dire lorsqu'un gène est KO homozygote et l'autre est hétérozygote (*Ctns* -/- *Pqlc2* +/- *ou Ctns* +/- *Pqlc2* -/-), naissent avec une fréquence réduite. Ainsi l'absence d'un des deux gènes révèlerait une haploinsuffisance de l'autre. Cela pose la question de quels pourraient être les mécanismes en jeu dans la létalité synthétique du DKO.

La cystinosine et *PQLC2* possèdent un profil de sélectivité de substrats bien distinct : cystine pour la cystinosine, acides aminés cationiques pour *Pqlc2*. Il est donc peu probable que la cause de la létalité du DKO soit une redondance fonctionnelle de ces deux transporteurs lysosomaux. La cystinosine et *PQLC2* participent donc de manière synergique à une fonction vitale durant le développement embryonnaire, et la perte de cette fonction n'est pas compensée efficacement par l'organisme. L'intérêt de ce projet est donc de tenter d'identifier

cette nouvelle fonction pour laquelle la cystinosine et PQLC2 coopèrent durant le développement de l'embryon de souris, et d'en comprendre les bases moléculaires.



C57BL/6N ***Pqlc2*** **KO**

Pas de phénotype évident

X. Leray, données non publiées



C57BL/6J ***Ctns*** **KO**

- Accumulation de cystine dans les lysosomes
- Défauts oculaires, osseux, rénaux (qui miment la pathologie humaine)
- Non létal chez la souris

S Cherqui et al., Mol Cell Biol 2002
Nevo et al., Nephrol Dial Transplant 2009

***Ctns* +/- *Pqlc2* +/-**

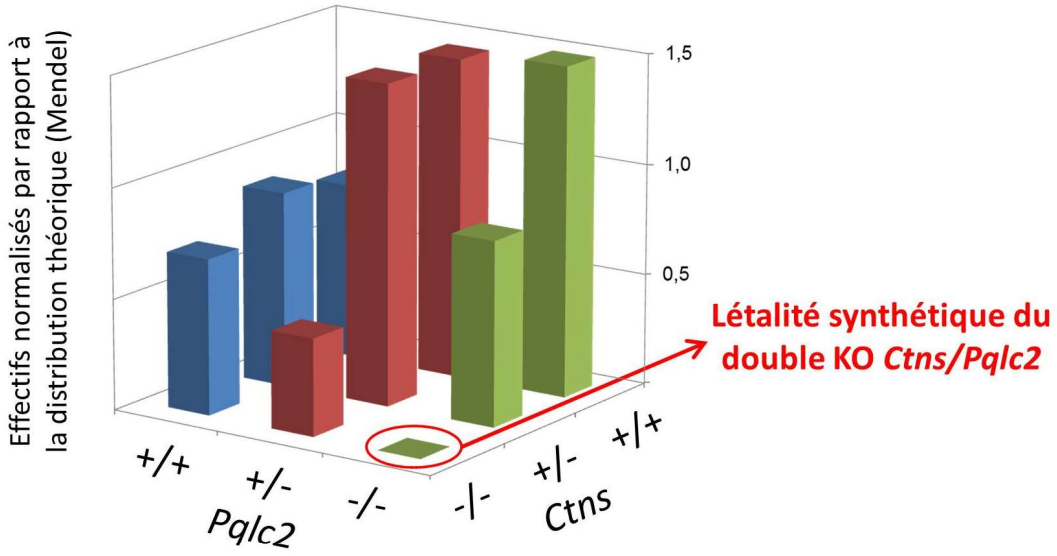


Figure 17 : Létalité synthétique induite par la perte concomitante de *Ctns* et *Pqlc2* chez la souris. Les modèles murins KO pour ces deux transporteurs lysosomaux sont croisés pour produire une première génération de double hétérozygotes ; ces individus sont ensuite croisés entre eux et la distribution des génotypes des portées est observée. On voit une absence totale de naissances d'animaux doublement KO.
N = 265 naissances ; χ^2 test vs distribution théorique (Mendel) : $p < 10^{-6}$
X. Leray et S. O'Regan, données non publiées

b) Objectifs de la thèse

Afin de comprendre la nature de l'interaction génétique entre la cystinosine et PQLC2 et le rôle de cette interaction dans l'embryogénèse chez la souris, nous avons envisagé deux angles d'approche complémentaires, la progression de l'un pouvant informer l'autre. Nous avons abordé les questions suivantes :

Angle 1 : Caractérisation phénoménologique du phénotype embryonnaire induit par le DKO.

- Quel est le décours temporel d'apparition des défauts morphologiques des embryons DKO ? Ces embryons sont-ils dysmorphiques en totalité ou certaines zones sont-elles plus affectées (dans ce cas, lesquelles) ?

  Comprendre la mise en place de ces défauts peut nous aiguiller sur leur cause moléculaire.

- Le sac vitellin des embryons DKO est-il altéré ?

  Les cellules endodermales du sac vitellin s'appuient sur la protéolyse lysosomale des sécrétions maternelles pour fournir des nutriments à l'embryon ; la perte de deux transporteurs lysosomaux pourrait perturber la fonction lysosomale, et donc la nutrition histiotrophique.

- Retrouve-t-on un défaut du DKO de *Ctns* et *Pqlc2* dans d'autres modèles biologiques ? Le DKO n'affecte-t-il que le développement embryonnaire ?

  Le DKO de ces deux transporteurs n'est pas létal chez C. elegans (Liu et al., 2012) *; cependant l'utilisation d'une approche réductionniste sur un modèle cellulaire DKO nous permettrait une plus grande facilité d'accès pour la détection de défauts induits par le DKO.*

<u>Angle 2 : Recherche des bases moléculaires de l'interaction génétique</u>

- La convergence des effets de chaque simple KO reflète-t-elle la perte d'une ou de plusieurs fonctions connues de ces transporteurs ?

  Par exemple, la cystinosine comme PQLC2 ont été mentionnés dans la littérature comme capables d'influencer la machinerie de senseur des niveaux d'acides aminés lysosomaux (Joseph Amick et al., 2020; Andrzejewska et al., 2016).

- Le phénotype DKO reflète-t-il la perte de fonctions encore non identifiées de *Ctns* et *Pqlc2* ? Si oui, quelles sont ces fonctions ?

  La fonction commune remplie par ces deux transporteurs se repose possiblement sur des rôles que nous ne leur connaissons pas ; c'est particulièrement le cas pour Pqlc2, découvert relativement récemment par l'équipe et peu étudié par d'autres groupes.

- Peut-on faire le lien entre les bases mécanistiques de l'interaction génétique entre *Ctns* et *Pqlc2* et le phénotype embryonnaire du DKO ?

  La correction de la létalité du DKO par une action ciblée sur les fonctions de ces transporteurs serait la meilleure preuve de leur implication directe dans le développement embryonnaire.

Depuis plusieurs années, la communauté scientifique prend peu à peu conscience de la place centrale occupée par les lysosomes dans l'homéostasie cellulaire, de par leurs rôles dans des processus essentiels comme l'autophagie mais aussi dans des voies de signalisation majeures comme la voie mTORC1. De plus, les perturbations de la fonction lysosomale font partie des caractéristiques fréquemment retrouvées dans des pathologies neurodégénératives et les cancers, soulignant l'importance de cet organite dans la physiologie de la cellule. En parallèle, des découvertes récentes faisant état de la capacité de différents transporteurs de la membrane du lysosome à fonctionner comme des transcepteurs (transporteur/récepteur) place cette catégorie particulière de protéines comme des candidats intéressants au poste de régulateurs des fonctions signalétiques des lysosomes au sein de la cellule.

L'ambition de ce travail de thèse est donc d'explorer une nouvelle fonction de deux transporteurs lysosomaux d'acides aminés dans le développement embryonnaire de la souris, ce qui à notre connaissance n'a jamais été rapporté auparavant. La compréhension des bases moléculaires de l'interaction génétique entre Ctns et Pqlc2 pourrait révéler des rôles inattendus joués par ces transporteurs lysosomaux dans la cellule.

RESULTATS

A) Caractérisation de la létalité synthétique du double KO de *Ctns* et *Pqlc2*

a) Poursuite de la validation du KO de *Pqlc2* dans le modèle murin

Les docteurs Xavier Leray et Seana O'Regan avaient créé et caractérisé un modèle murin constitutivement déficient pour *Pqlc2*. L'inactivation du gène avait été vérifiée à l'échelle de l'ADN par séquençage et à l'échelle de l'ARN par analyse des transcrits (voir annexe 1), mais pas au niveau de la protéine en l'absence d'anticorps efficace. La création de cette lignée de souris faisait suite aux travaux antérieurs du laboratoire (Jezegou et al., 2012) qui identifiaient PQLC2 au 'système c' (R L Pisoni, Thoene, & Christensen, 1985; Ronald L Pisoni et al., 1987) transportant les acides aminés cationiques à travers la membrane des lysosomes. Xavier Leray avait poursuivi la caractérisation des propriétés mécanistiques du transporteur et avait notamment montré qu'il pouvait fonctionner de manière bidirectionnelle (cf. introduction). La connaissance de ces propriétés permettait d'établir un test d'activité de *PQLC2* sur lysosomes isolés, pour apporter une preuve fonctionnelle de l'inactivation de la protéine chez les souris KO.

Mon laboratoire d'accueil possède le matériel pour effectuer des fractionnements cellulaires et purifier des lysosomes à partir de tissus puis les utiliser dans des expériences de transport de substrats radiomarqués. Normalement, la purification d'organites se fait en deux étapes :

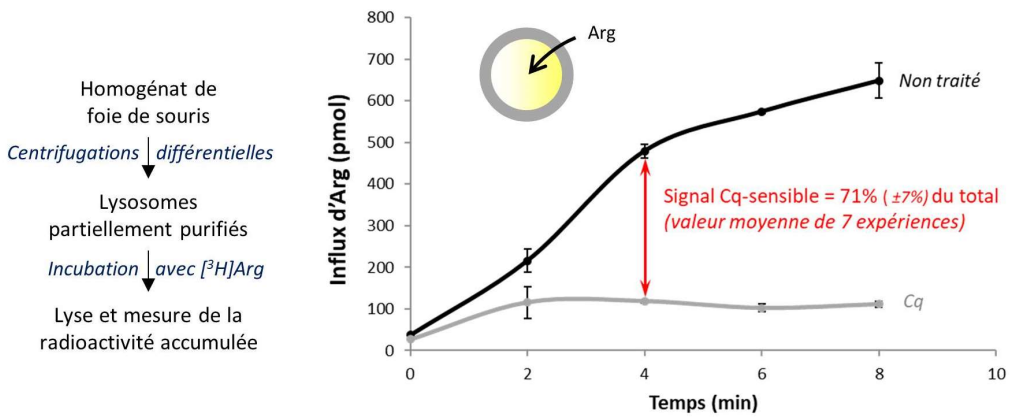
centrifugations différentielles, puis séparation isopycnique ; ce protocole permet une purification satisfaisante des lysosomes, mais il est lourd et requiert l'extraction de 7 à 8 foies de souris par génotype pour obtenir une quantité suffisante de matériel biologique. Cette approche n'étant pas adaptée à des expériences exploratoires, nous avons opté pour un protocole « simplifié » rapide et nécessitant moins d'animaux (1 à 2 souris par condition) qui se base uniquement sur des étapes de centrifugation différentielles optimisées.

L'inconvénient de ce protocole est que les lysosomes sont moins purifiés. Afin de discriminer le signal lysosomal et le signal non spécifique, c'est-à-dire celui associé aux organites contaminants, chaque mesure (temps, condition expérimentale) est réalisée avec ou sans pré-incubation 10 min avec 500 µM de chloroquine. La chloroquine neutralise le pH lysosomal, or PQLC2 a besoin d'un pH luminal acide pour fonctionner (Jezegou et al., 2012). La part de signal sensible à la chloroquine est calculé à partir du signal obtenu avec les lysosomes non traités (signal total), auquel on soustrait le signal résistant à la chloroquine (signal non spécifique) ; nous utilisons ce signal chloroquine-sensible comme une estimation de la part de signal due à l'activité de transporteurs lysosomaux (figure 18 A).

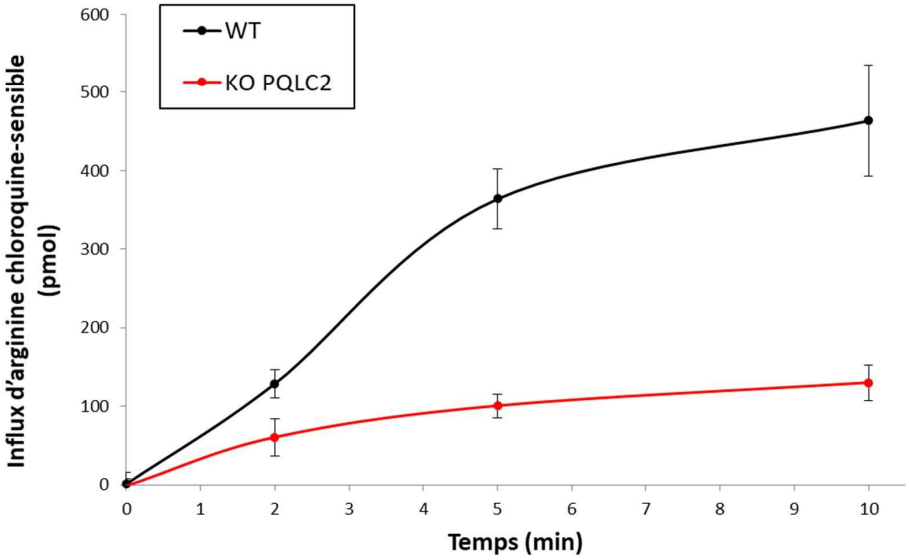
Le test d'activité de *PQLC2* que nous avons employé consiste à mesurer l'influx lysosomal d'arginine marquée par le radio-isotope tritium, plutôt que l'efflux. En effet, PQLC2 est un uniporteur, il est donc découplé du gradient de protons lysosomal et peut ainsi fonctionner de manière bidirectionnelle et importer ses substrats si les lysosomes sont polarisés négativement. Cette polarisation négative est obtenue en utilisant un tampon pauvre en cations, ce qui établit un gradient de ces espèces ioniques, notamment protons et sodium, entre la lumière lysosomale et l'extérieur. Les lysosomes sont incubés pendant différentes durées puis filtrés, rincés et la mesure de la radioactivité accumulée à l'intérieur des lysosomes

est effectuée avec un compteur à scintillation. Chaque point expérimental est réalisé en triple (en double sur des lysosomes traités avec la chloroquine).

A



B



C

Date	Proportion du signal PQLC2-dépendant (à t=5min)
22/03/18	71,6 %
25/04/18*	72,4 %
03/05/18	45,6 %

** expérience représentée en B*

Figure 18 : Mise en évidence de l'influx d'arginine dans les lysosomes dépendant de l'activité de transport de PQLC2. (A) L'approche expérimentale consiste en une purification partielle des lysosomes issus de foie de souris suivi d'une expérience d'influx d'arginine radiomarquée, effectuée avec ou sans prétraitement avec 500 µM de chloroquine (Cq) ; l'influx observé en présence de Cq traduisant une activité de transport indifférente au pH, la soustraction de ce signal au signal obtenu sans prétraitement permet une estimation approximative de l'influx lysosomal (Cq-sensible, pH-dépendant). **(B)** Comparaison de l'influx d'arginine Cq-sensible dans des lysosomes issus de souris WT ou *Pqlc2* KO. **(C)** Part de l'influx d'arginine Cq-sensible dépendante de l'activité de PQLC2 calculée sur 3 expériences différentes.

Des lysosomes partiellement purifiés ont donc été préparés à partir de foies de souris WT et de souris *Pqlc2* KO et utilisés pour mesurer l'influx d'arginine tritiée. Comme on peut le voir sur la figure 18 B, la perte du transporteur réduit l'influx d'arginine. Plus exactement, trois expériences indépendantes montrent que *PQLC2* est responsable d'une part importante (71,6%, 72,4% et 45,6% de l'influx). Nous n'avons pas d'explication à la valeur plus basse obtenue pour la troisième expérience ; possiblement une polarisation négative moins grande de la membrane lysosomale si une fuite de cations inorganiques s'était produite.

A nouveau, il faut insister sur le fait que le protocole de purification des lysosomes que nous avons utilisé est imparfait et comprend certainement une part de contamination qui conduit à surestimer la part d'influx d'arginine indépendante de *PQLC2*. Bien que ces expériences soient informatives, il faudrait les répéter en effectuant une purification plus poussée afin d'isoler mieux le signal spécifiquement lysosomal et d'être dans le meilleur état de l'art.

En conclusion, l'inactivation du gène *Pqlc2* réduit fortement le transport d'arginine, et probablement d'autres acides aminés cationiques, à travers la membrane lysosomale. *PQLC2* est donc la voie majeure de passage de l'arginine à travers la membrane des lysosomes, et peut-être des autres acides aminés cationiques, mais ce n'est pas la seule voie ; d'autres protéines peuvent aussi transporter cet acide aminé à travers la membrane lysosomale.

b) Facteurs influençant la létalité synthétique induite par la perte de *Ctns* et *Pqlc2*

1) Expression de la létalité synthétique

Durant ses travaux de thèse, le Dr. Xavier Leray a découvert une interaction synthétique létale entre les gènes *Ctns* et *Pqlc2* chez la souris. En effet, en cherchant avec le Dr. Seana O'Regan à générer une lignée murine doublement KO (DKO) par croisement de souris doublement hétérozygotes (*Ctns* +/- *Pqlc2* +/-), jamais aucun souriceau DKO ne naissait. De plus, les souriceaux avec un génotype dit « triallélique », c'est-à-dire un gène KO homozygote et l'autre gène hétérozygote, naissaient avec une fréquence réduite, suggérant une létalité synthétique partielle associée à ces génotypes (cf. introduction). Ces phénomènes de létalité synthétique du DKO et de létalité partielle des génotypes trialléliques ont été confirmés dans d'autres modalités de croisements, lesquels étaient en cours lors de mon arrivée au laboratoire. J'ai poursuivi ces travaux.

Ces travaux consistaient à croiser des souris trialléliques dans deux types de croisements : des croisements dit « symétriques » dans lesquels le mâle et la femelle ont le même génotype (soit *Ctns* +/- ; *Pqlc2* -/-, soit *Ctns* -/- ; *Pqlc2* +/-), et des croisements « asymétriques » dans lesquels ils ont un génotype inverse (soit ♂ *Ctns* -/- ; *Pqlc2* +/- x ♀ *Ctns* +/- ; *Pqlc2* -/-, soit ♂ *Ctns* +/- ; *Pqlc2* -/- x ♀ *Ctns* -/- ; *Pqlc2* +/-). Par rapport aux croisements entre double hétérozygotes, l'avantage de ces types de croisements est double : (1) ils maximisent la probabilité théorique de naissance d'un DKO (25% en l'absence de létalité synthétique), ce qui permet d'obtenir des résultats significatifs avec un plus petit effectif de naissances ; (2) ils

réduisent le nombre de génotypes possibles par naissance (3 et 4 catégories pour les croisements symétriques et asymétriques, respectivement), simplifiant ainsi l'analyse statistique et permettant de mieux détecter des effets subtils comme la létalité partielle des génotypes trialléliques.

Les résultats de ces expériences sont présentés en figures 19 et 20. La distribution observée est systématiquement soumise à un test de Chi² pour détecter des déviations significatives par rapport à des modèles théoriques de transmission génétique : un modèle de transmission dit « Mendelien » qui ne tient pas compte de la létalité du DKO, et un modèle de létalité synthétique récessive-récessive (LSRR) qui considère que la létalité apparait si et seulement si l'individu ne possède aucune copie fonctionnelle de chaque gène. Xavier Leray ayant par ailleurs montré durant sa thèse que la létalité n'est pas gamétique (données non montrées), nous ne comparerons pas les distributions observées au modèle de létalité gamétique.

Ces résultats confirment la létalité synthétique du DKO (à l'exception de la naissance d'un unique individu DKO, qui sera présentée dans la section suivante), et par conséquent le rejet du modèle de transmission Mendélien dans tous les types de croisements. Le fait que la perte concomitante de *Ctns* et *Pqlc2* soit létale pendant le développement embryonnaire, comme le montrent les données antérieures de Xavier Leray, est en contraste avec la viabilité du simple KO de chaque gène. Cela suggère que les deux gènes coopèrent pour la réalisation d'une fonction biologique indispensable au développement embryonnaire.

A Croisements symétriques *Ctns* +/- ; *Pqlc2* -/-

Génotype	Observé		Modèle de transmission Mendelien	Modèle de létalité synthétique récessive-récessive (LSRR)
	Effectif	%		
Ctns +/+ ; *Pqlc2* -/-	332	37,9%	25,0%	33,3%
Ctns +/- ; Pqlc2 -/-	543	62,0%	50,0%	66,7%
Ctns -/- ; Pqlc2 -/-	1	0,1% *	25,0%	0,0%
Total	876	100%	100%	100%
		Test de Chi²	4,75E-66	N.A. ; p = 0,004 si DKO non pris en compte

B Croisements symétriques *Ctns* -/- ; *Pqlc2* +/-

Génotype	Observé		Modèle de transmission Mendelien	Modèle de létalité synthétique récessive-récessive (LSRR)
	Effectif	%		
Ctns -/- ; *Pqlc2* +/+	373	40,5%	25,0%	33,3%
Ctns -/- ; Pqlc2 +/-	547	59,5%	50,0%	66,7%
Ctns -/- ; Pqlc2 -/-	0	0,0%	25,0%	0,0%
Total	920	100%	100%	100%
		Test de Chi²	1,50E-73	3,50E-06

Figure 19 : Transmission génétique des allèles mutés de *Pqlc2* et *Ctns* dans les croisements d'animaux trialléliques de même génotype (croisement symétriques). (A) Distribution des génotypes des souris nées de croisements symétriques *Ctns* +/- ; *Pqlc2* -/-. **(B)** Distribution des génotypes des souris nées de croisements symétriques *Ctns* -/- ; *Pqlc2* +/-.
** valeur non représentative de la fréquence réelle de naissance d'individus DKO, voir texte*

Une autre observation intéressante que l'on peut faire sur ces données est que, comme illustré dans la figure 20 C, les souriceaux avec un génotype triallélique naissent avec une fréquence moindre par rapport aux doubles hétérozygotes. Cela correspond au phénomène de létalité synthétique partielle associée à ces génotypes décrit par Xavier Leray. Lorsque cette létalité partielle est suffisamment forte, la distribution des génotypes varie assez pour que le test de Chi² rejette le modèle de LSRR. Ce phénomène permet de révéler un effet de dose de l'inactivation des gènes *Ctns* et *Pqlc2* : lorsqu'un gène est complètement inactivé, le nombre de copies de l'autre devient un facteur limitant pour la viabilité de l'embryon, un phénomène qui s'apparenterait à une haploinsuffisance conditionnelle. Cette observation contraste avec

le fait que les souris qui naissent avec un génotype triallélique ne présentent pas d'anomalie particulière ou de morbidité supplémentaire par rapport aux simples KO. C'est une information complémentaire importante, puisque cela suggère qu'il existe une période critique au cours du développement durant laquelle les embryons trialléliques présentent une fragilité particulière, mais qu'une fois cette période passée leur génotype n'induit pas d'effet néfaste. Il est vraisemblable que la létalité des embryons DKO se déclenche pendant cette période critique de développement. Cependant, cette hypothèse doit être envisagée avec prudence car il est également possible que la létalité partielle des génotypes trialléliques et la létalité presque totalement pénétrante du DKO procèdent de mécanismes différents.

De manière intéressante, la létalité partielle des trialléliques se manifeste de manière plus prononcée dans les croisements avec une femelle de génotype *Ctns* -/- ; *Pqlc2* +/- qu'avec l'autre génotype triallélique (figures 19 et 20). Ceci suggère l'existence d'un effet maternel lié à la perte de fonction complète de la cystinosine. Ce génotype particulier aurait donc un effet biologique qui serait néfaste pour la gestation et donc le développement embryonnaire.

A Croisements asymétriques ♂ Ctns -/- ; Pqlc2 +/- x ♀ Ctns +/- ; Pqlc2 -/-

Génotype	Observé		Modèle de transmission Mendelien	Modèle de létalité synthétique récessive-récessive (LSRR)
	Effectif	%		
Ctns +/- ; *Pqlc2* +/-	24	41%	25%	33%
Ctns -/- ; Pqlc2 +/-	14	24%	25%	33%
Ctns +/- ; Pqlc2 -/-	21	36%	25%	33%
Ctns -/- ; Pqlc2 -/-	0	0%	25%	0%
Total	59	100%	100%	100%
		Test de Chi²	3,60E-05	0,262

B Croisements asymétriques ♂ Ctns +/- ; Pqlc2 -/- x ♀ Ctns -/- ; Pqlc2 +/-

Génotype	Observé		Modèle de transmission Mendelien	Modèle de létalité synthétique récessive-récessive (LSRR)
	Effectif	%		
Ctns +/- ; *Pqlc2* +/-	39	51%	25%	33%
Ctns -/- ; Pqlc2 +/-	10	13%	25%	33%
Ctns +/- ; Pqlc2 -/-	27	36%	25%	33%
Ctns -/- ; Pqlc2 -/-	0	0%	25%	0%
Total	76	100%	100%	100%
		Test de Chi²	2,49E-10	2,29E-04

C

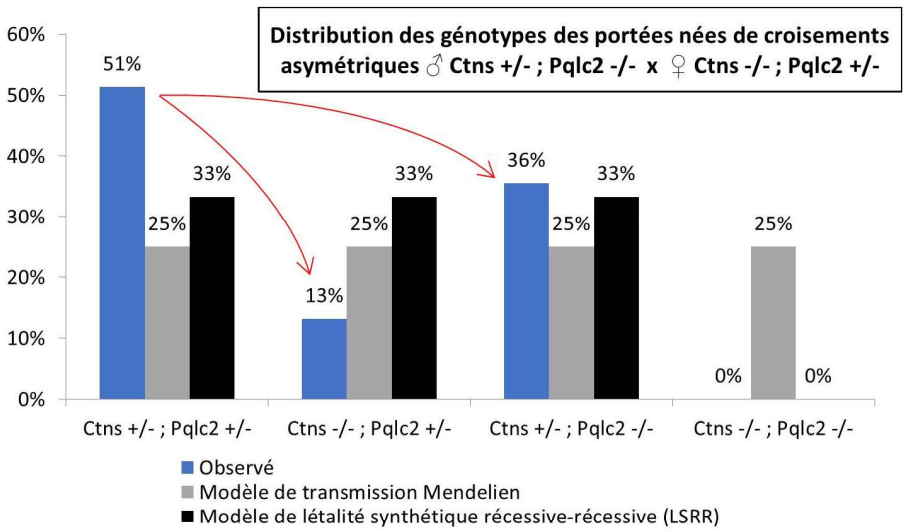


Figure 20 : Transmission génétique des allèles mutés de *Pqlc2* et *Ctns* dans les croisements d'animaux trialléliques de génotype inverse (croisement asymétriques). (A) Distribution des génotypes des souris nées de croisements asymétriques ♂ *Ctns* +/- ; *Pqlc2* -/- x ♀ *Ctns* -/- ; *Pqlc2* +/-. **(B)** Distribution des génotypes des souris nées de croisements asymétriques ♂ *Ctns* +/- ; *Pqlc2* -/- x ♀ *Ctns* -/- ; *Pqlc2* +/-. **(C)** Illustration de la distribution obtenue avec les croisements asymétriques ♂ *Ctns* +/- ; *Pqlc2* -/- x ♀ *Ctns* -/- ; les flèches rouges soulignent la diminution relative de naissance d'animaux trialléliques par rapport aux double hétérozygotes.

2) Etude de cas : observation d'un rare survivant double KO

La létalité embryonnaire synthétique du double KO de *Ctns* et *Pqlc2* est apparue comme totalement pénétrante jusqu'à la naissance inattendue en juin 2019 d'un souriceau DKO. Pour être précis, il était arrivé à deux reprises (une fois pendant la thèse de Xavier Leray, une fois pendant ma thèse) que l'on trouve dans une cage d'accouplement le cadavre d'un très jeune souriceau présentant une morphologie anormale, et un génotype DKO mais sans que l'on puisse savoir s'ils étaient mort-nés ou morts juste après la naissance. Cela nous indiquait cependant que le génotype DKO pouvait induire des degrés de morbidité différents. Sur plus de 2000 naissances dans des accouplements susceptibles de générer des individus DKO, il s'agit du seul souriceau qui ait survécu : c'est donc un évènement très rare.

La souris DKO est une femelle née le 12 juin 2019 d'un accouplement symétrique *Ctns* +/- ; *Pqlc2* -/-. La portée dans laquelle elle est née comprenait aussi deux femelles de génotype *Ctns* +/+ ; *Pqlc2* -/- et un mâle de génotype *Ctns* +/- ; *Pqlc2* -/-. Nous avons donc tiré parti du génotype *Pqlc2* KO de ses sœurs afin de les utiliser comme témoins (figure 21 A). La figure 21 C présente le suivi de poids de ces souris au cours du temps. Comme on peut le voir la DKO est plus légère, ce qui tend à indiquer que son développement embryonnaire a vraisemblablement été partiellement altéré. En revanche, elle a une prise de poids comparable aux contrôles (et même très légèrement plus importante) durant les deux premiers mois de sa vie, sa croissance ne semble donc pas affectée. Cette souris DKO est plus petite (7,0 cm de long contre 8,2 et 8,5 pour les contrôles) et elle possède une queue plus courte (6,6 cm contre 7,0 et 7,3), ce qui est cohérent avec la différence de poids.

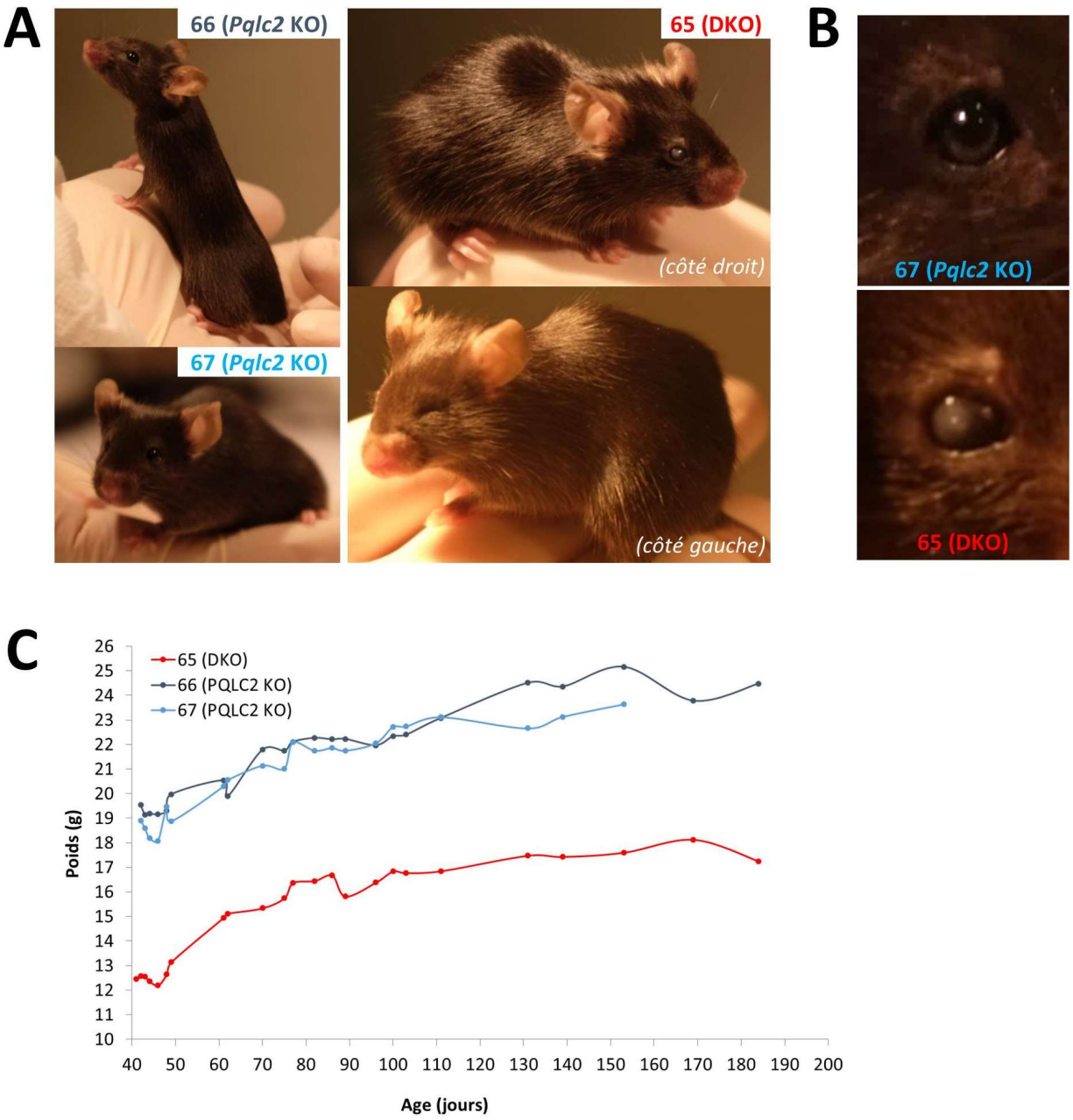


Figure 21 : Comparaison de la survivante DKO (souris 65) avec ses sœurs *Pqlc2* KO (souris 66 et 67). (A) Photographies des souris 65 (DKO), 66 et 67 *(Pqlc2* KO) à P43. **(B)** Zoom sur l'œil droit de la souris DKO pour comparaison avec la souris contrôle *Pqlc2* KO ; la tache blanche au niveau de la rétine suggère une cataracte. **(C)** Suivi de poids de ces animaux au cours du temps ; les pesées sont effectuées à horaire fixe pour minimiser les variations liées au rythme circadien. L'arrêt de la courbe de poids de la souris 67 est dû à son décès de cause inconnue.

Un test SHIRPA et des tests moteurs complémentaires sont disponibles en annexe 16 et ont été réalisés avec l'aide des docteurs Isabelle Fanget et Christine Anne-Longin, et Guillaume Tricot (stagiaire M2) ; photographies docteur Bruno Gasnier

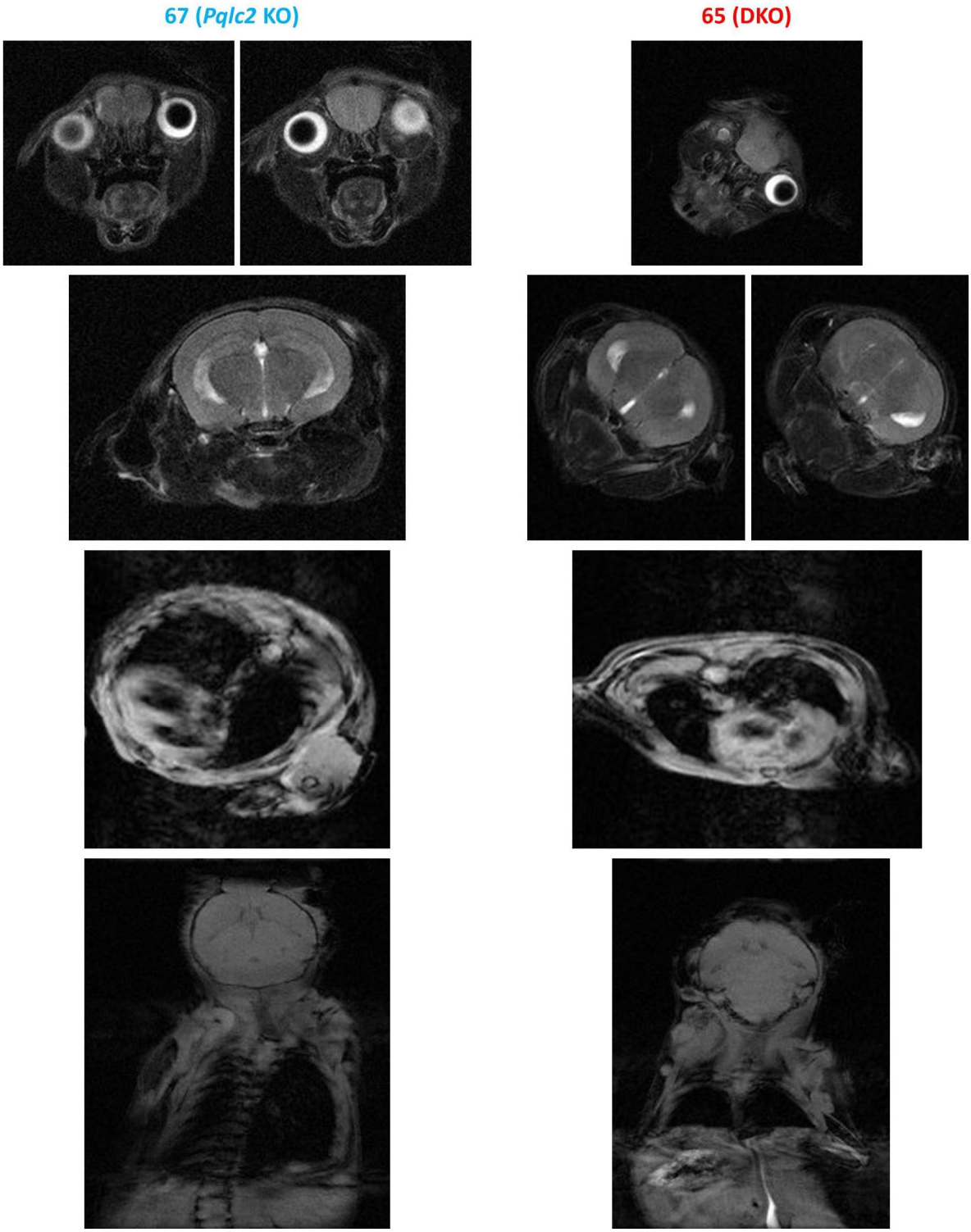


Figure 22 : Imagerie par résonnance magnétique de la survivante DKO (souris 65) avec un contrôle *Pqlc2* KO (souris 67). Ligne 1 : cavité buccale, bulbe olfactif et yeux, vue transversale. Ligne 2 : cerveau et hippocampe, vue transversale. Ligne 3 : poumons, cœur et colonne vertébrale, vue transversale. Ligne 4 : cerveau, colonne vertébrale et poumons, vue coronale. Certaines images sont présentées sur deux plans successifs en raison d'une orientation imparfaite des animaux dans l'IRM.
Imagerie réalisée sur la plateforme LIOPA (imagerie du petit animal) de l'université Descartes avec l'aide du docteur Bich-Thuy Doan.

On voit nettement sur les figures 21 B et 22 que ses yeux présentent des anomalies : l'œil droit présente les caractéristiques d'une cataracte (mais on ne peut pas affirmer qu'il s'agisse de cela) avec une tache blanche visible au centre de l'œil ; l'œil gauche quant à lui est complètement occlus. L'imagerie par résonnance magnétique (IRM) réalisée sur cette souris à l'âge de 44 jours a révélé que l'œil gauche est sous-développé et ne fonctionne probablement pas. Nous avons effectué un test simple pour évaluer si cette souris était aveugle, ou fortement malvoyante. Ce test consiste à suspendre la souris par la queue, puis à l'approcher progressivement du bord d'une cage ou d'un support ; une souris ayant une vision normale va tendre les pattes antérieures vers le bord pour essayer de le saisir et de s'y accrocher, alors qu'une souris incapable de voir le bord ne fera rien. Les souris utilisées comme contrôles avaient bien une vision normale. En revanche, la souris DKO n'a jamais essayé d'agripper le bord après plusieurs essais, ses capacités visuelles sont donc très fortement perturbées voire inexistantes.

Le reste de l'IRM a révélé l'absence d'anomalie majeure de ses organes vitaux tels que le cœur ou les poumons. On ne voit pas non plus de problèmes majeurs de développement cérébral. Si des défauts existent, ils ne sont pas d'une ampleur suffisante pour être détectés dans cette expérience. En effet la résolution planaire et axiale de notre analyse est limitée, et nos sujets (contrôle comme DKO) n'étaient pas parfaitement orientés dans les axes antéro-postérieur et para-sagittal, ce qui limite l'analyse qu'il est possible de faire sur ces images. Les souris sont anesthésiées avec de l'isoflurane pendant toute la durée de l'IRM ; une exposition prolongée à ce gaz étant nocive et compte tenu de la rareté de cette souris DKO, nous n'avons pas voulu la mettre en danger et nous avons donc limité la durée de l'expérience.

Nous avons évalué le comportement et la motricité de la souris DKO et des deux souris contrôle en employant différents tests, dont les résultats sont présentés en annexe 16. Lorsqu'elle se déplace librement dans la cage, la souris DKO effectue les mêmes actions (et à une fréquence similaire) que les souris contrôle : exploration de la cage, déplacements verticaux, redressement sur les pattes arrière, toilettage, interaction avec les autres souris de la cage. Nous avons testé les réflexes sensorimoteurs des yeux (fermeture de l'œil lorsqu'on le touche avec un coton), des vibrisses et les oreilles (rétractation au contact), qui sont tous normaux chez cette souris. Nous avons effectué un test de basculement de la cage qui a révélé que cette souris perçoit normalement son inclinaison. Les souris ont aussi été soumises au test du rotarod, dans lequel la DKO a obtenu un meilleur score que les contrôles (2'52'' contre 1'38'' et 1'59'') révélant qu'elle n'a pas de problèmes d'équilibre ni de coordination motrice.

Dans un test de force, le test de suspension à une grille renversée (wire hang test), la DKO tenait plus longtemps que les souris témoin, mais ce résultat pourrait être biaisé par le fait qu'elle est plus légère. Le test d'open-field sert à estimer l'état de stress d'une souris en comparant le temps qu'elle passe dans le centre de l'open-field (ce qui est une situation stressante pour une souris) contre le temps passé en périphérie (bords de la boite). La DKO passe la quasi-totalité de son temps en périphérie, mais cela est probablement biaisé par le fait que sa vision soit fortement altérée. Elle est donc plus dépendante de ses vibrisses pour s'orienter. Une observation que nous avions faite lorsqu'elle était âgée d'un mois et demi était une impression d'un défaut asymétrique de coordination motrice et une légère crispation de tout son côté droit, mais ce phénomène n'a plus jamais été détecté par la suite. Ces résultats sont donc plus difficiles à interpréter.

Globalement, les résultats de ces tests sont à nuancer : le but était de détecter éventuellement un problème majeur chez la DKO qui pourrait indiquer d'une part un risque pour sa survie ou son bien-être, et d'autre part révéler un phénotype marqué du DKO chez l'adulte. Les tests de phénotypage murin sont normalement effectués sur des cohortes de plusieurs animaux afin de s'assurer de la robustesse de l'observation. Malheureusement cela nous est impossible compte tenu de la faible fréquence de naissance de souris DKO (1/2000 environ). De plus, les traits que l'on observe chez cette souris (petite taille, anomalies oculaires) sont vraisemblablement des conséquences de défauts développementaux plutôt qu'un effet du génotype à l'âge adulte. Il est évident que l'outil indispensable qu'il nous faudrait utiliser pour discriminer les deux est un modèle de KO inductible, mais nous ne le possédons pas.

Cependant, la naissance de cette souris et sa survie jusqu'à l'âge adulte en relativement bonne santé constituent en soi une information importante : cela signifie que la cystinosine et PQLC2 participent de concert à une fonction biologique vitale pour le développement embryonnaire, mais qu'après la naissance cette fonction biologique est soit (1) dispensable, soit (2) compensée par l'organisme. Dans le deuxième cas, on peut imaginer que le(s) gène(s) compensant la perte de *Pqlc2* sont exprimés à l'âge adulte mais pas pendant le développement embryonnaire, ou encore que l'importance de la fonction remplie par *PQLC2* soit spécifique du développement ou de la physiologie embryonnaire. A ce stade de l'étude, nous ne pouvons pas répondre à cette question. On notera tout de même que l'idée d'une fenêtre critique dans le développement fait écho à la situation des génotypes trialléliques qui souffrent d'une létalité partielle sans défaut manifeste des souris échappant à cette létalité. L'un des enjeux ici est donc de comprendre si cette période critique est la même chez les doubles KO que chez les trialléliques.

c) Caractérisation des défauts embryonnaires

La létalité synthétique du DKO se produit durant le développement embryonnaire, et n'est pas gamétique. Les docteurs Xavier Leray et Christine Anne avaient apporté une preuve directe de cela en étudiant les embryons au stade E12,5 issus de croisements symétriques *Ctns* +/- ; *Pqlc2* -/-. Ils avaient découvert que des embryons DKO étaient bien présents, mais qu'ils présentaient en revanche une dysmorphie céphalique prononcée. Bien que n'ayant pas pu conclure sur la fenêtre précise de létalité, ils avaient en revanche constaté qu'une partie des embryons DKO avaient un cœur fonctionnel et que la mort de ces embryons se produisait vraisemblablement aux alentours de ce stade et plus tard dans le développement.

Une partie de ce travail de thèse a été consacrée à la caractérisation de ces embryons DKO, avec pour objectif d'approfondir la description des défauts morphologiques, d'identifier le décours temporel de leur apparition et, idéalement, d'identifier les mécanismes biologiques à leur origine. En premier lieu, nous avons travaillé au même stade de développement (E12,5) puis nous avons étudié des stades plus précoces (E10,5 et un début d'analyse à E8,5). Nous avons utilisé le même schéma de croisements (croisements symétriques *Ctns* +/- ; *Pqlc2* -/-) pour produire ces embryons car ces géniteurs sont obtenus avec une meilleure fréquence (figure 19 A).

A

Croisements symétriques *Ctns* +/- ; *Pqlc2* -/-

Génotype des embryons E12,5	Observé		Distribution Mendelienne
	Effectif	%	
Ctns +/+ ; *Pqlc2* -/-	31	30%	25%
Ctns +/- ; Pqlc2 -/-	55	53%	50%
Ctns -/- ; Pqlc2 -/-	17	17%	25%
Total	103	100%	100%

Chi² vs Mendel	0,260

B

Croisements symétriques *Ctns* +/- ; *Pqlc2* -/-

Génotype des embryons E10,5	Observé		Distribution Mendelienne
	Effectif	%	
Ctns +/+ ; *Pqlc2* -/-	25	25%	25%
Ctns +/- ; Pqlc2 -/-	56	57%	50%
Ctns -/- ; Pqlc2 -/-	18	18%	25%
Total	99	100%	100%

Chi² vs Mendel	0,118

Figure 23 : Transmission génétique des allèles mutés de *Pqlc2* et *Ctns* chez les embryons de souris issus de croisements symétriques *Ctns* +/- ; *Pqlc2* -/-. Distribution des génotypes des embryons aux stades E12,5 **(A)** et E10,5 **(B)** de développement.

L'analyse de la transmission génétique des allèles de *Pqlc2* et *Ctns* au sein de la population d'embryons prélevés est présentée en figure 23. Aux deux stades étudiés (E10,5 et E12,5) les embryons DKO sont présents à hauteur de 17-18% de la population totale. C'est un peu moins que la proportion attendue de 25% mais le test de Chi² n'indique pas de déviation significative par rapport au modèle de transmission Mendélien. Cela confirme que la fenêtre de létalité se situe vraisemblablement plus tard dans le développement. La mise en place des défauts morphologiques des embryons et leur mort se produisent donc à des moments distincts.

1) Analyse au stade E12,5

Le premier niveau d'observation des embryons se fait à la loupe binoculaire lors de la dissection de l'utérus gravide. Le type de croisements que nous utilisons, c'est à dire entre trialléliques *Ctns* +/- *Pqlc2* -/- (figure 24 A), nous permet de générer au sein des portées des individus *Pqlc2* KO, que nous utilisons comme contrôles de référence par rapport aux DKO. L'observation de la morphologie des embryons nous a permis d'identifier des traits phénotypiques présents chez l'ensemble des embryons DKO : une taille réduite (figure 24 B) ainsi qu'une dysmorphie prononcée de la région céphalique accompagnée d'une absence de pigmentation des yeux (figure 24 C). Après avoir disséqué 17 portées à E12,5 donnant un total de plus d'une centaine d'embryons, nous avons observé que la dysmorphie céphalique est présente dans 100% des cas ; c'est aussi le cas pour la réduction de taille et l'absence de pigmentation des yeux, à l'exception d'un unique DKO ne présentant ces traits que de manière très atténuée. En revanche, il nous était impossible de distinguer les embryons *Pqlc2* KO des embryons trialléliques sur des critères morphologiques. Des embryons représentatifs de chacun de ces trois génotypes provenant d'une même portée sont présentés figure 24 C. La comparaison à des embryons sauvages n'est pas montrée.

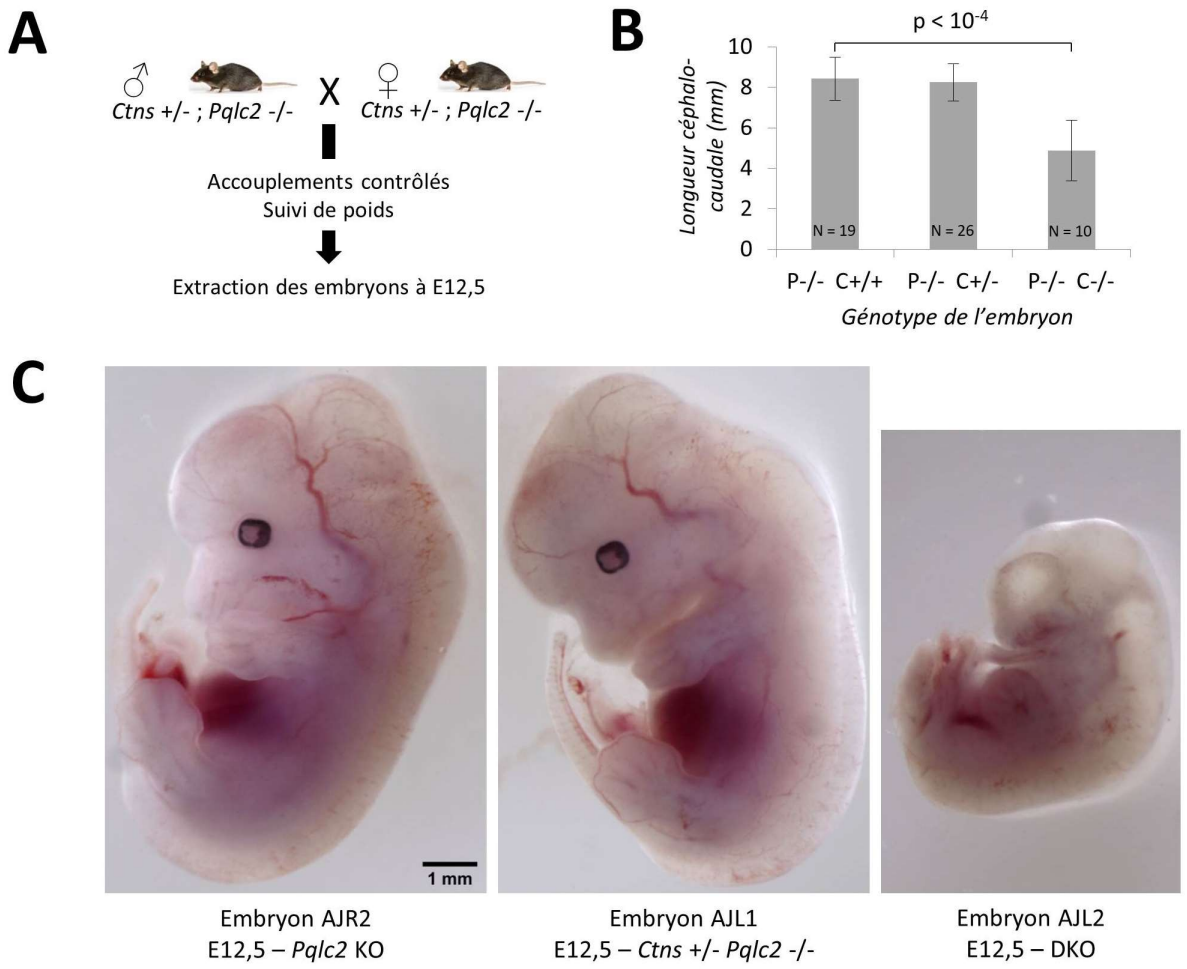


Figure 24 : Les embryons DKO sont présents mais dysmorphiques au stade E12,5. (A) Des souris femelles *Ctns* +/- *Pqlc2* -/- sont mises en accouplement une nuit avec un mâle du même génotype ; leur gestation est contrôlée par suivi de prise de poids, puis les souris gravides sont euthanasiés après 12 jours et les embryons immédiatement extraits **(B)** Comparaison de la taille des embryons DKO avec celles des autres embryons issus de ces croisements au stade E12,5 ; l'évaluation de la taille se fait par mesure de la longueur céphalo-caudale. **(C)** Photographies en lumière blanche d'embryons de souris au stade E12,5. Les embryons trialléliques *Ctns* +/- *Pqlc2* -/- ne présentent pas de différences morphologiques avec les *Pqlc2* KO, en revanche les DKO sont plus petits et ont une dysmorphie céphalique prononcée ainsi qu'une absence de pigmentation rétinienne.
Barres d'erreur = déviation standard

Pour la réduction de taille, il est intéressant de souligner que la taille des embryons DKO est réduite significativement ($p < 0,0001$) de 47% par rapport aux *Pqlc2* KO issus de ces mêmes croisements ; en revanche là encore la taille des embryons de génotype triallélique (*Ctns* +/- ; *Pqlc2* -/-) n'est absolument pas impactée par rapport aux *Pqlc2* KO (figure 24 B) et est identique à la taille attendue pour des embryons sauvages de cette lignée à ce stade de développement (Mu, Slevin, Qu, McCormick, & Adamson, 2008). Si l'effet délétère du

génotype triallélique commence à s'exercer avant E12,5 celui-ci n'est en tout cas pas visible sur les embryons à ce stade.

Afin d'analyser plus finement les défauts morphologiques observés chez les embryons DKO, nous avons initié une analyse histologique de ces embryons. Pour cela, nous nous sommes associés avec le Dr. Philippe Djian (équipe 1 du SPPIN) qui possède une grande expérience dans ce domaine et l'équipement nécessaire. Une ingénieure de l'équipe, Brigitte Delhomme, m'a formé à l'histologie en cryosections et sur coupes de paraffine. Dans un premier temps, nous avons effectué des cryosections car c'était la méthode la plus rapide et facile à mettre en œuvre pour nous, mais par la suite nous sommes passés à des coupes en paraffine afin d'améliorer la qualité des coupes. Cette analyse présentait deux difficultés majeures : (1) l'orientation des coupes, en particulier des sections transversales, qui nécessitait des réajustements fréquents de l'angle de coupe, et (2) le coating des lames ainsi que l'optimisation du protocole de coloration hématoxyline-éosine (H&E). Ainsi l'exploitation de certaines sections a été perturbée par ces problèmes techniques. Nous nous sommes principalement basés sur l'atlas d'histologie de Kaufmann pour effectuer les comparaisons entre nos coupes et la situation attendue chez des embryons sauvages (annexe 3).

Ces résultats nous ont apportés deux séries d'informations : la première est qu'à priori et malgré la taille réduite des DKO, nous n'avons pas observé de défauts morphologiques évidents en dehors de la région céphalique. On retrouve bien la présence des viscères, du cœur, du foie, du tube neural et des somites chez les embryons DKO comme chez les *Pqlc2* KO (figure 25 et 26 A et B, première section). Certains embryons DKO étaient 'vrillés', ce qui n'a pas facilité leur orientation et l'analyse des coupes histologiques.

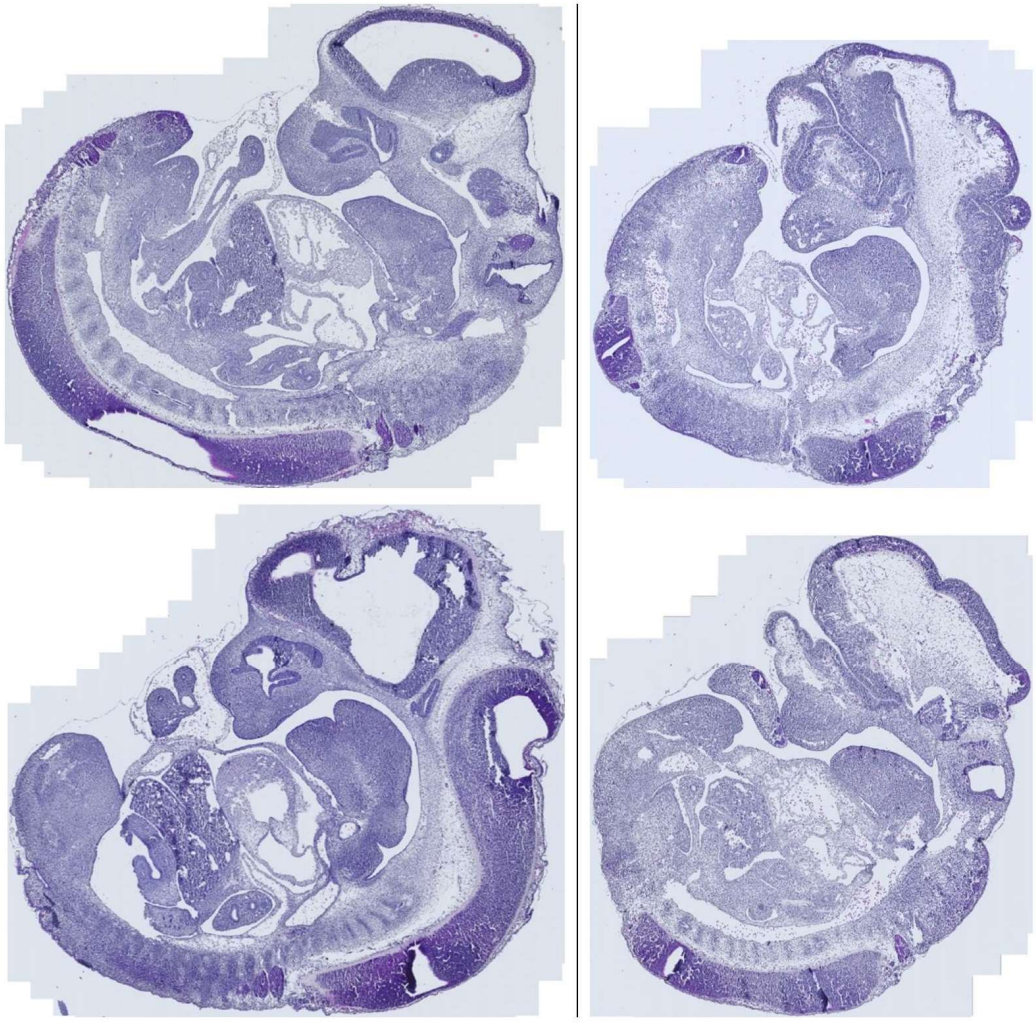
Il n'est cependant pas possible à partir de ces données de conclure de manière certaine à l'absence de défauts dans le bas du corps des embryons DKO. Si des défauts existent, il nous faudrait pour les trouver initier une analyse plus exhaustive (nombre de réplicats biologiques et nombre de coupes par échantillons) et une meilleure résolution pour les identifier. De telles approches existent, notamment la microscopie épiscopique à haute résolution (High Resolution Episcopic Microscopy, HREM), qui consiste à combiner de la microscopie optique à haute résolution planaire avec une automatisation des coupes histologiques pour obtenir une très bonne résolution axiale et un grand volume de données, relativement exhaustif, permettant la reconstitution 3D (Geyer, Maurer-Gesek, Reissig, & Weninger, 2017). Une autre approche possible assez similaire consisterait à transpariser les embryons (optical clearing), puis d'utiliser un microscope à feuillets de lumière (Light Sheet Microscope) pour réaliser des coupes optiques. Certaines techniques de transparisation telles que CLARITY possèdent en outre l'avantage de pouvoir éventuellement combiner l'imagerie de l'embryon avec le marquage de protéines d'intérêt par immunofluorescence (B. Yang et al., 2014). Dans un cas comme dans l'autre, ces techniques demandent un matériel et une expertise que nous n'avons pas au laboratoire ; si les embryons DKO possèdent un phénotype en dehors de la région céphalique, ce phénotype est vraisemblablement limité et il ne nous apparait pas comme prioritaire d'investir dans un axe d'étude visant à l'explorer.

L'autre information que l'on tire de ces images est une description plus précise des défauts céphaliques. Comme on peut le voir sur les figures 25 (coupes parasagittales) et 26 (coupes transversales), les futurs ventricules cérébraux des embryons DKO sont anormaux. Plus exactement, soit ils ne se forment pas, soit ils sont sous-développés et malformés. En revanche, le tube neural semble se fermer correctement chez ces embryons. L'image

présentée sur la figure 26 B semble montrer une déformation par rapport au contrôle, mais il est possible qu'il s'agisse uniquement d'un problème de coupe.

Sur certaines sections d'embryons DKO, nous avons détecté un matériel éosinophile non nucléé pouvant s'apparenter à des débris cellulaires dans certaines parties des ventricules cérébraux et dans la lumière du tube neural (non montré). Suspectant qu'il pourrait également s'agir d'agrégats protéiques, nous avons fait un marquage à la Thioflavine S, qui n'a pas donné de résultat concluant (non montré). Ces observations restent cependant isolées et nous ne pouvons pas exclure qu'elles soient artéfactuelles.

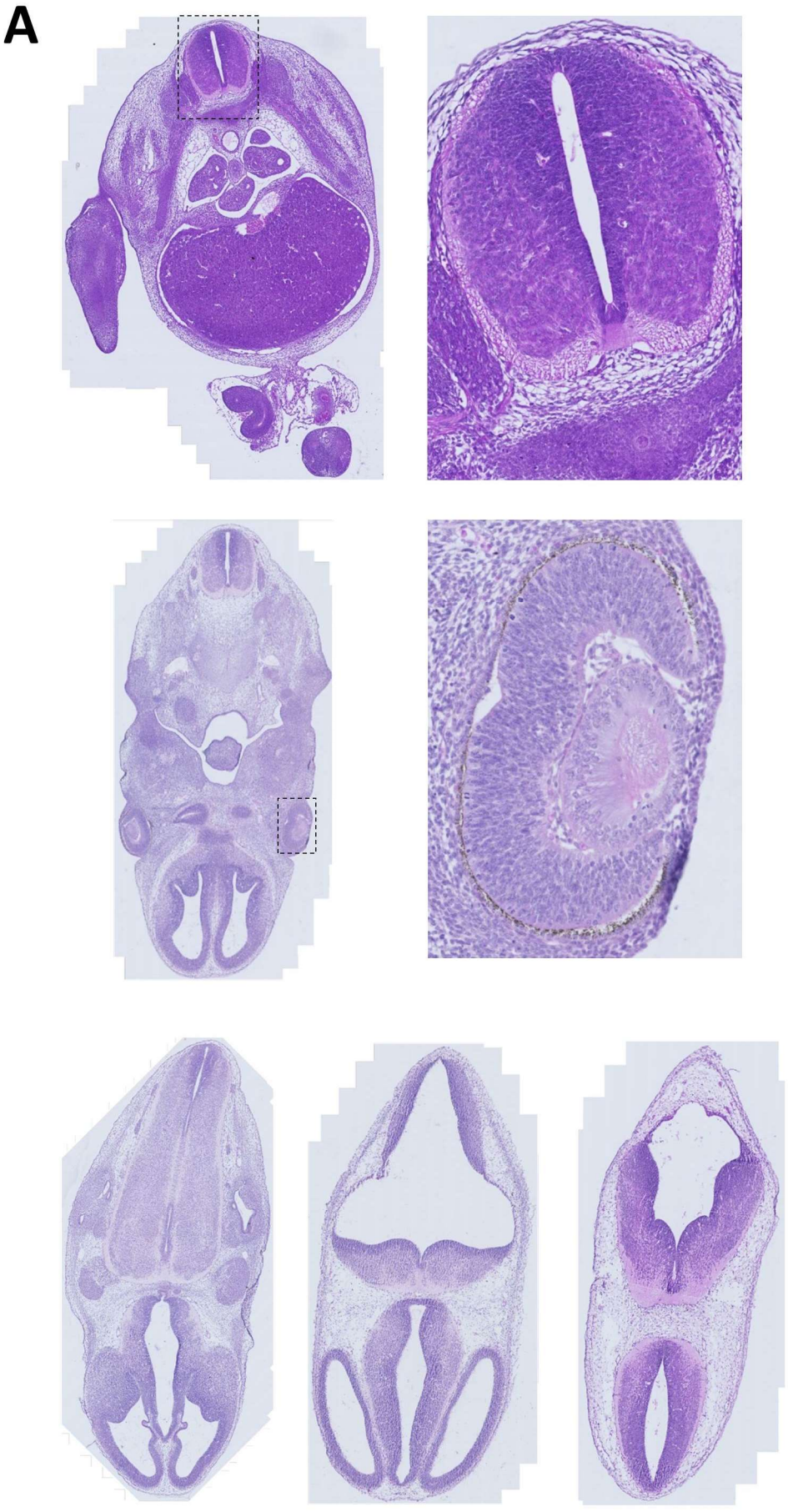
Comme nous allons le voir dans la partie suivante, les embryons DKO au stade E10,5 présentent déjà un phénotype relativement prononcé. Par conséquent, la pertinence de l'analyse morphologique des embryons DKO au stade E12,5 est limitée, puisque les défauts sont déjà très avancés. Il n'est donc pas possible à partir de ces données d'identifier le ou les processus biologiques dérégulés induisant le phénotype DKO ni de comprendre le décours temporel de sa mise en place.



Embryon AMR3
E12,5 - *Pqlc2* KO

Embryon AML2
E12,5 - DKO

Figure 25 : Comparaison en vue sagittale d'un embryon *Pqlc2* KO et d'un embryon DKO au stade E12,5. Sections en paraffine de 3 µm d'épaisseur colorées en H&E réalisées par la plateforme Histomics en orientation parasagittale. Deux plans par embryons sont montrés. Chez les deux génotypes on distingue bien le cœur, le tube digestif, le foie et les somites ; en revanche on voit un défaut de formation des vésicules cérébraux chez le DKO.
Acquisition au scanner de lames Zeiss Axioscan Z1


A

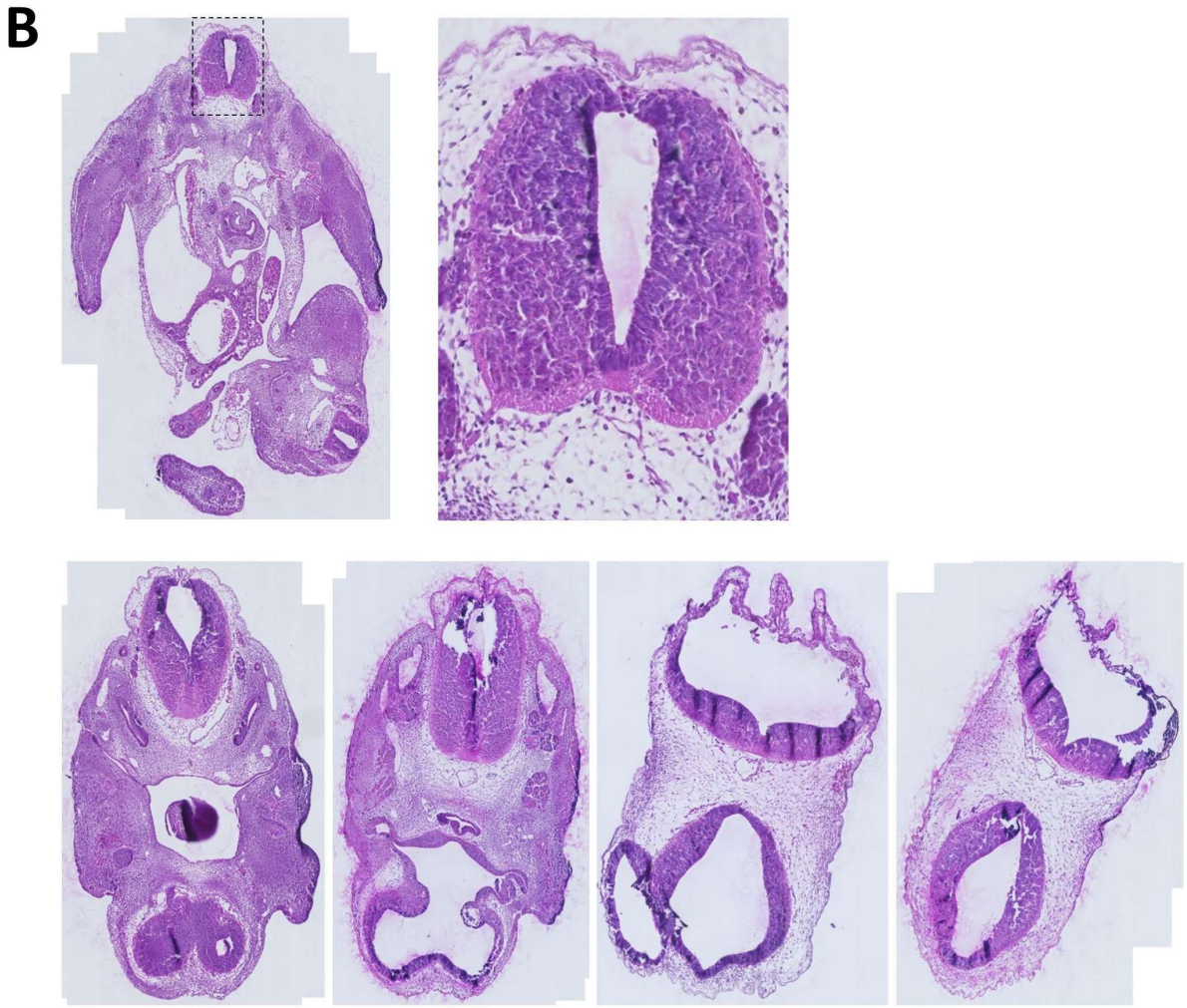


Figure 26 : Analyse histologique du phénotype DKO au stade E12,5. Sections en paraffine de 5 µm d'épaisseur en orientation transversale d'un embryon *Pqlc2* KO **(A)** et d'un embryon DKO **(B)** au stade E12,5. Divers plans sont présentés dans un ordre caudal → rostral et se focalisent particulièrement sur la région la plus rostrale. Les carrés en pointillés indiquent les zones sur lesquels un agrandissement est montré. Pour toutes les images, le pôle dorsal et en haut et le pôle ventral est en bas. Des sections issues de l'atlas d'histologie de Kaufman correspondant à ces plans de coupe pour des embryons WT sont disponibles en annexe 3.
Acquisition au scanner de lames Zeiss Axioscan Z1 – embryon Pqlc2 KO = ADR1 ; embryon DKO = AJL2

2) Analyse au stade E10,5 et antérieur

La visualisation en lumière blanche des embryons à 10 jours de gestation permet de visualiser que la dysmorphie céphalique est déjà bien établie (figure 27 A) ainsi que la réduction de taille céphalo-caudale par rapport aux *Pqlc2* KO et aux trialléliques (figure 27 B). Cependant, les

embryons sont plus petits qu'au stade E12,5 et leur morphologie est moins développée ; si l'on ajoute à cela qu'ils sont partiellement transparents, tous ces éléments font que la visualisation en lumière blanche n'offre pas une résolution satisfaisante. Nous avons employé une approche alternative consistant à colorer les embryons avec du DAPI, puis à visualiser la fluorescence des noyaux cellulaires ainsi marqués avec un macroscope à fluorescence MacroFluo Leica Z6 APO, disponible sur la plateforme 'LIOPA' d'imagerie du petit animal de la faculté de pharmacie de l'université Descartes (http://piv.parisdescartes.fr/modalites-imagerie/optique/).

Cette approche permet de visualiser de manière plus nette la morphologie des embryons (on distingue nettement les somites et le cœur par exemple), mais permet surtout de révéler des aspects qu'on ne pouvait pas voir en lumière blanche : en particulier, on distingue la lentille dans la vésicule optique (pas encore pigmentée à E10,5) ainsi que la segmentation du tube neural dans la région céphalique en prosencéphale (le plus antérieur), mésencéphale et rhombencéphale (le plus postérieur) (figure 27 C, embryon WT). Cette segmentation est conservée chez les embryons *Pqlc2* KO et trialléliques.

Quatre embryons DKO sont présentés en figure C. Les traits conservés chez ce génotype sont :

- Une réduction de la taille globale (céphalo-caudale).
- Une malformation des vésicules optiques ; on en voit le contour mais la lentille semble absente chez ces embryons.
- Des défauts de segmentation du tube neural céphalique, qui semble affecter tout particulièrement le mésencéphale et le prosencéphale dont le développement apparait réduit.

Il semble que le phénotype DKO s'exprime chez les embryons avec des degrés d'intensités différentes. On note par exemple que l'embryon AZL1, sur la gauche, présente ces caractéristiques de manière qualitativement plus prononcées que l'embryon AOR4, sur la droite (figure 27 C, ligne du bas). Certains embryons présentent parfois des dysmorphies supplémentaires : par exemple, l'embryon BCL1 montre un défaut de fermeture du tube neural, les crêtes neurales n'ayant pas fusionné au niveau rostral, (figure 27 C en bas à droite). Enfin, on note que les embryons DKO présentent parfois des retards développementaux importants (figure 27 D), ici 2 sur 7 embryons DKO observés au macroscope à fluorescence.

J'ai aussi effectué une analyse histologique de ces embryons à E10,5, mais celle-ci présentait diverses difficultés techniques. D'une part nous avons perdu partiellement ou complètement une partie des échantillons en raison de leur petite taille et de leur fragilité prononcée après imprégnation en paraffine, et d'autre part en raison des caractères morphologiques moins développés qu'à E12,5, il était plus difficile d'orienter correctement les embryons pour s'assurer d'obtenir des coupes exploitables.

La diminution moyenne de taille des embryons DKO par rapport aux embryons contrôle *Pqlc2* KO est de 30% ($p < 0,0001$), ce qui est moins important qu'au stade E12,5 mais reste très prononcé. Cette étude au stade E10,5 est intéressante car elle permet de mieux comprendre l'origine des défauts observés au stade E12,5 mais les défauts présentés par les DKO à ce stade sont déjà importants et bien établis, ce qui suggère qu'il se mettent en place encore plus tôt dans le développement.

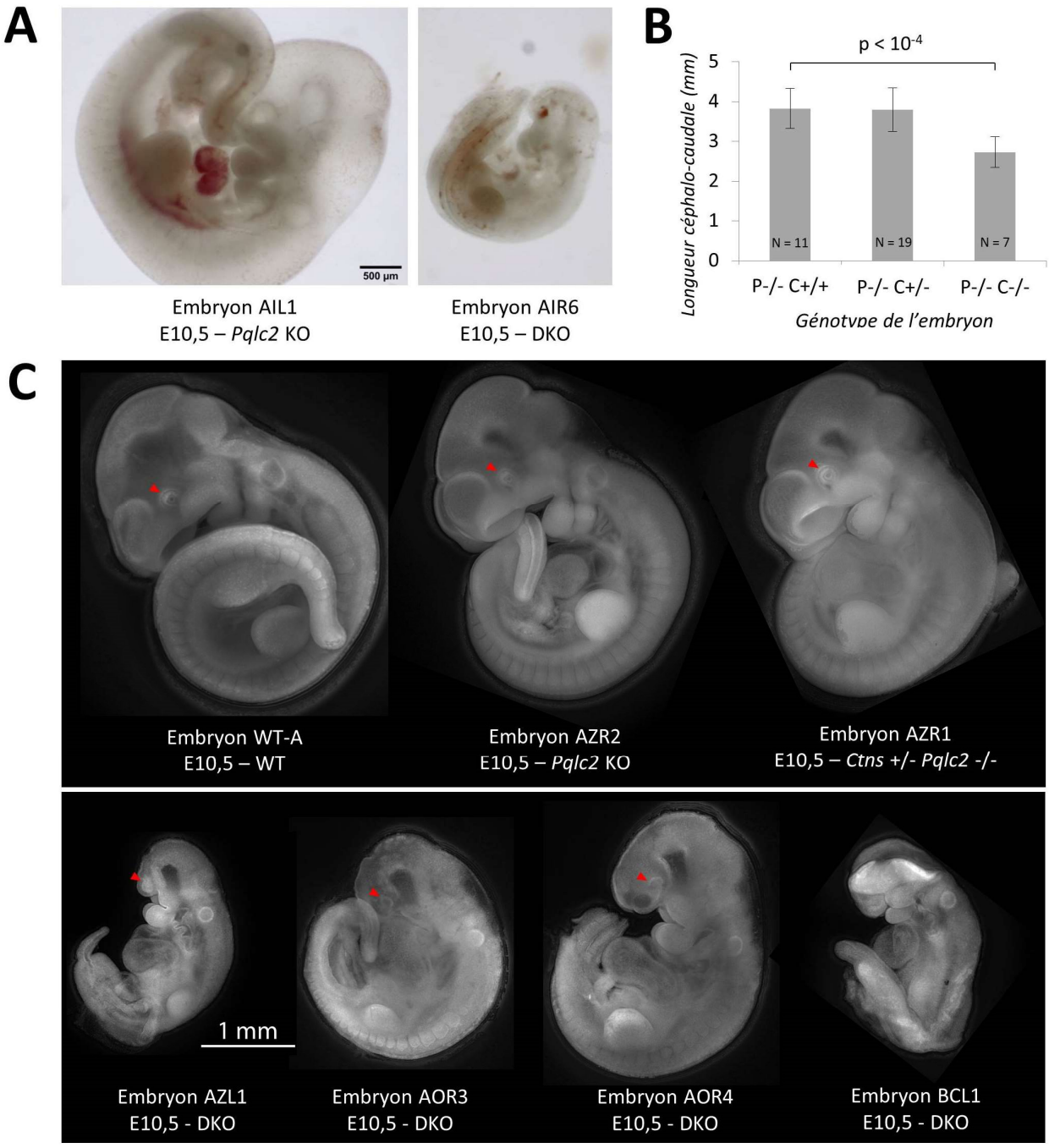


Figure 27 : Caractéristiques morphologiques des embryons DKO au stade E10,5. (A) Photographies en lumière blanches d'embryons de souris *Pqlc2* KO et DKO au stade E10,5. **(B)** Comparaison de la taille (céphalo-caudale) des embryons DKO avec celles des autres embryons issus de ces croisements au stade E10,5. **(C)** Images d'embryons colorés au DAPI obtenues au macroscope à fluorescence. La ligne du haut illustre l'absence d'anomalies morphologiques évidentes des embryons *Pqlc2* KO ou trialléliques par rapport aux embryons sauvages (WT) ; la ligne du bas montre quatre embryons DKO illustrant la variabilité du phénotype embryonnaire de ce génotype. **(D)** Les embryons DKO présentent occasionnellement des retards de croissance nets, illustré ici par l'embryon BAL1 (stade de Theiler estimé à 12-13, contre 16-17 pour les embryons normalement observés à E10,5).
Les pointes de flèche indiquent le vésicule optique ; barres d'erreur = dev. std

Lorsque l'on observe un phénotype embryonnaire associé à une mutation, la démarche normalement suivie est de remonter de plus en plus précocement dans le développement jusqu'à un stade où on ne voit plus de différence par rapport au contrôle, et ainsi comprendre la mise en place du phénotype. Nous avons commencé une analyse au stade E8,5 de développement, mais cette étude est encore très préliminaire et ne permet pas d'apporter de conclusions. Un premier résultat semblait indiquer une apoptose accrue au pôle rostral de l'embryon (annexe 2), c'est donc une piste prometteuse qu'il serait intéressant de confirmer.

3) Conclusions et limites de l'analyse morphologique des embryons

Nous avons pu mettre en évidence que les DKO présentaient des défauts morphologiques de manière robuste dès E10,5 : une dysmorphie de la région céphalique, en particulier des vésicules optiques et du tube neural au niveau du mésencéphale et du prosencéphale. En outre, ces embryons DKO ont une taille réduite et présentent occasionnellement un retard de développement. Il est relativement fréquent que les mutations constitutives des modèles murins utilisés en laboratoire induisent un retard développemental ; ainsi, il n'est pas aberrant que l'on retrouve cette caractéristique chez certains embryons DKO. L'absence de données d'histologie de qualité satisfaisante à E10,5 limite notre visibilité sur la formation du tube neural des embryons DKO et le détail de leur morphologie. Comme mentionné plus haut, une alternative intéressante serait de transpariser ces embryons et de réaliser des coupes optiques.

Ne connaissant pas le décours temporel d'apparition des défauts morphologiques, nous avions commencé l'analyse à E12,5 comme point d'entrée, cependant la gravité des défauts

observés à ce stade et le fait qu'ils soient déjà observables plus tôt (E10,5 de manière claire) suggèrent que nous avons pu observer des conséquences secondaires, voire tertiaires ou quaternaires, de la double inactivation de *Ctns* et *Pqlc2*. Un autre aspect critiquable de notre analyse histologique à E12,5 est que dans son état actuel, elle utilise des embryons *Pqlc2* KO comme contrôles pour les DKO, la comparaison aux embryons WT se basant sur l'utilisation de l'atlas d'histologie embryonnaire de Kaufman (annexe 3). Ces expériences ont été réalisées ainsi pour des raisons purement pratiques et en se basant sur l'absence de phénotype des souris *Pqlc2* KO à l'âge adulte. Il faudrait idéalement initier une analyse beaucoup plus poussée de la morphologie des embryons *Pqlc2* KO pour documenter l'absence de différence par rapport aux WT.

Dans l'ensemble, cette analyse morphologique des embryons a permis de décrire plus précisément le phénotype de dysmorphie induit par le DKO par rapport aux observations initiales en lumière blanche. Elle n'a cependant pas permis de conclure de manière univoque sur l'origine de ce phénotype. On insistera tout de même sur le fait que les défauts sont particulièrement prononcés au niveau céphalique chez les DKO, ce qui n'est pas sans rappeler les pathologies de malformations du tube neural (Neural Tube Defects, NTD). La principale différence réside sans doute dans le fait que les NTD se manifestent sous la forme d'un défaut de fermeture du tube neural au niveau de certaines zones charnières, là où le phénotype DKO semble induire de graves malformations du tube neural mais n'empêche pas sa fermeture (sauf quelques exceptions). L'information essentielle est que, à l'instar des NTD, l'apparition des défauts affectant particulièrement le tube neural est un révélateur du décours temporel d'apparition de ces défauts. Le processus impacté par la perte de *Ctns* et *Pqlc2* coïncide vraisemblablement avec la neurulation.

Enfin, il est intéressant de constater que les défauts des vésicules optiques ainsi que la réduction de taille observés chez les embryons DKO se traduisent chez l'unique souris DKO ayant atteint l'âge adulte par des défauts oculaires (un œil non formé, l'autre apparemment non fonctionnel) ainsi qu'une taille et un poids réduits. Le fait que l'on retrouve des anomalies oculaires est donc cohérent, en revanche l'asymétrie du phénotype entre l'œil droit et gauche est surprenante. On peut facilement imaginer que la raison pour laquelle cette souris ne présente, semble-t-il, pas de défauts cérébraux majeurs, est que de telles anomalies ne sont pas viables et qu'il aurait été impossible qu'elle vive avec de tels défauts. La naissance de cet individu DKO et sa survie est reflètent la variabilité du phénotype DKO chez les embryons. Certains sont affectés plus gravement que d'autres, et on peut imaginer que la souris DKO a été particulièrement peu affectée, ce qui lui a permis de survivre, avec tout de même quelques séquelles.

La létalité du phénotype DKO n'est donc pas absolue, mais extrêmement pénétrante.

B) L'inactivation des gènes *Ctns* et *Pqlc2* impacte fortement le sac vitellin

a) Nouvelle hypothèse : les embryons DKO présentent-ils un défaut de nutrition histiotrophique ?

L'analyse des défauts morphologiques des embryons DKO nous a apporté une information essentielle : le phénotype est déjà sévère au stade E10,5 et sa mise en place est possiblement déjà amorcée à E8,5, suggérant qu'elle débute avant. Le fait que l'on observe des défauts prononcés de la région céphalique est cohérent avec le fait que cette période coïncide avec la neurulation chez la souris. La neurulation est donc une fenêtre critique pour la mise en place du phénotype. Cependant et malgré les informations apportées par cette analyse, le lien qui pourrait exister entre de telles anomalies développementales et l'activité de transporteurs lysosomaux n'est pas évident.

L'existence d'une fenêtre critique nous a amenés à rechercher les rôles connus des lysosomes durant le développement embryonnaire, et en particulier pendant la neurulation. Les cellules endodermales du sac vitellin viscéral (CESVV), un tissu extra-embryonnaire, endocytent des sécrétions de l'endométrium utérin puis utilisent la dégradation lysosomale pour produire des nutriments (acides aminés, etc.). L'apport de ces nutriments à l'embryon fait intervenir, en première ligne, des transporteurs lysosomaux qui en assurent l'efflux depuis leur site de production jusque dans le cytoplasme des CESVV. Ce phénomène, appelé nutrition histiotrophique, est la principale source de nutriments pour l'embryon avant que le placenta ne devienne fonctionnel et remplisse ce rôle.

Notre hypothèse est donc que l'inactivation de *Ctns* et *Pqlc2* aurait pour conséquence une séquestration de leurs substrats dans les lysosomes des CESVV, et donc une capacité fortement réduite du sac vitellin à fournir ces acides aminés à l'embryon. La létalité synthétique induite par l'inactivation des gènes *Ctns* et *Pqlc2* résulterait ainsi d'un défaut d'approvisionnement de l'embryon en cystéine et en acides aminés cationiques pendant la neurulation. Cette carence spécifique serait alors à l'origine des défauts des embryons DKO.

b) Altérations morphologiques du sac vitellin

Une des approches que nous avons employée pour étudier l'effet supposé de la perte de *Ctns* et *Pqlc2* sur la nutrition histiotrophique consistait en une analyse de la morphologie des cellules du sac vitellin. Des sacs vitellins fixés de différents génotypes ont été utilisés pour produire des cryosections de 5 µm d'épaisseur. Ces échantillons ont été analysés à l'aide de colorations histologiques ou de détection de protéines spécifiques par immunofluorescence.

1) Dilatation des compartiments lysosomaux

Des expériences d'immunomarquage de la protéine Lysosomal Membrane Associated Protein 1 (LAMP1), pour détecter les compartiments lysosomaux/endolysosomaux, ont été effectuées sur des sacs vitellins WT, *Ctns* KO, *Pqlc2* KO et DKO. Un exemple est présenté en figure 28 et un autre en annexe 4. On observe sur les coupes de sacs WT un marquage positif pour LAMP1

concentré au niveau du pôle apical des cellules de la monocouche endodermale, comme attendu. L'intensité du marquage suggère une concentration importante d'(endo)lysosomes dans cette région, ce qui est cohérent avec la spécialisation de ces cellules, chargées d'hydrolyser massivement des macromolécules extracellulaires pour nourrir l'embryon. On note la présence au sein de ces cellules de vacuoles positives pour LAMP1, plus grandes que les lysosomes, dont le nombre et la répartition sont très hétérogènes. Ces structures sont normalement présentes dans les CESVV et sont appelées vacuoles apicales. Elles tirent leur nom de leur homologie avec les vacuoles des plantes ; l'ensemble de leurs rôles n'est pas encore complètement compris, mais elles sont également chargées de la dégradation de macromolécules (Wada, 2013) (voir introduction).

En observant les coupes de sac vitellin dépourvu de *Pqlc2*, nous avons détecté la présence de vacuoles élargies, positives pour LAMP1, au niveau apical dans les CESVV. La présence de ces vacuoles n'est pas homogène sur toute la coupe, de même que leur taille : ainsi certaines cellules *Pqlc2* KO ressemblent au WT quand d'autres montrent un élargissement marqué des structures LAMP1. Le phénotype observé sur les échantillons *Ctns* KO est beaucoup plus prononcé : en effet, les vacuoles élargies positives pour LAMP1 sont plus nombreuses et globalement plus grandes. En outre, le phénotype se manifeste de manière homogène dans toute la couche endodermale du sac vitellin, suggérant que toutes les CESVV sont affectées de manière similaire. De plus, cette accumulation de larges vacuoles induit un gonflement important du volume cellulaire (nous reviendrons sur cet aspect du phénotype plus loin).

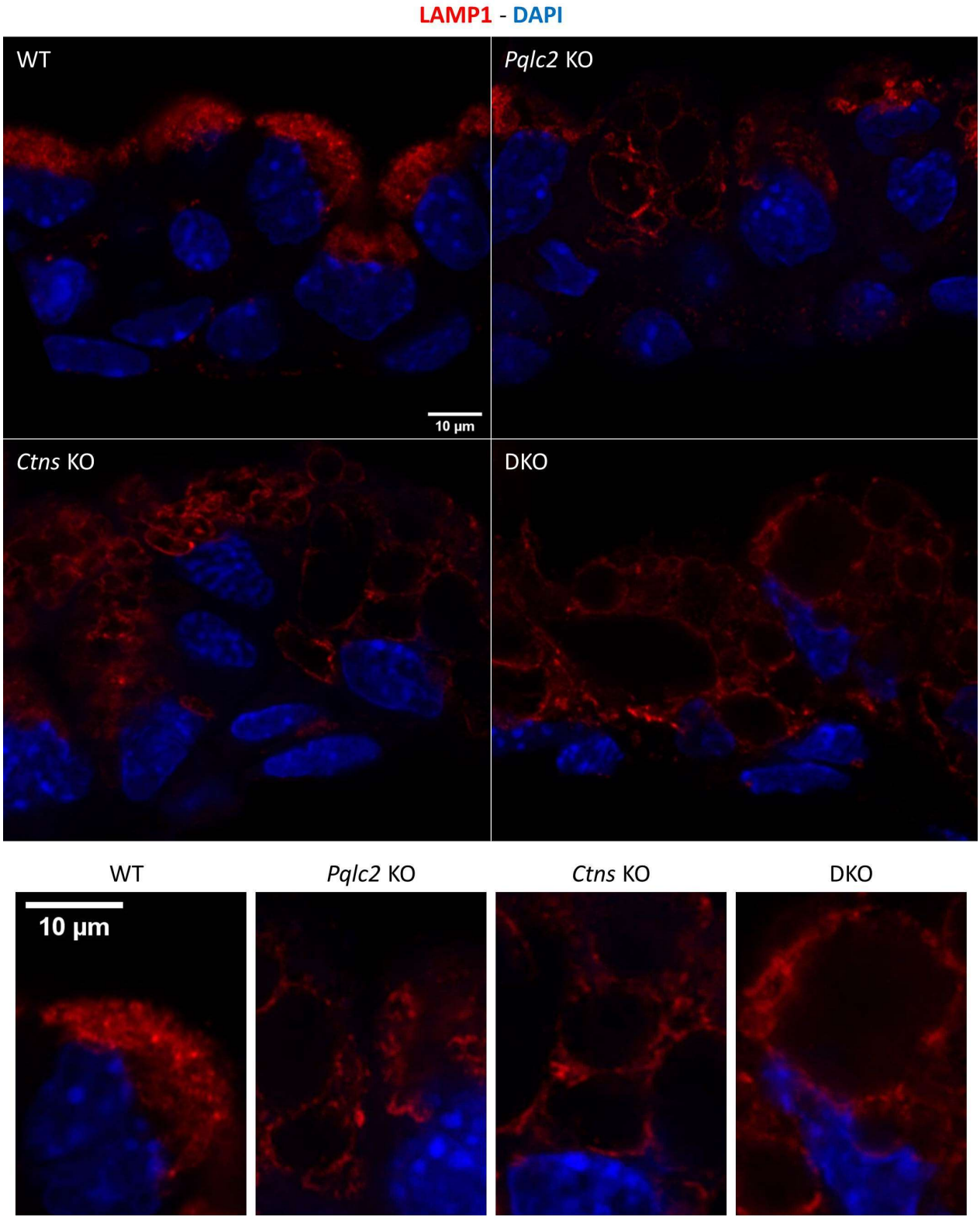


Figure 28 : Morphologie des compartiments (endo)lysosomaux du sac vitellin viscéral d'embryons de souris dépourvus de *Ctns* et/ou de *Pqlc2*. Détection du marqueur LAMP1 par immunofluorescence sur cryosections 5 µm de sacs vitellins d'embryons de souris WT et KO pour *Ctns* et/ou *Pqlc2*, au stade E10,5 de développement. Vue en champ large (haut) ou zoomé sur le pôle apical des cellules endodermales (ligne du bas).
Imagerie : microscope confocal Zeiss LSM 880 avec module Airyscan

Enfin, l'analyse des sacs vitellins DKO a révélé la présence de vacuoles LAMP1-positives encore plus larges (plus de 10 µm de diamètre pour certaines !) et d'un gonflement cellulaire encore plus prononcé. Les noyaux (marqués par le DAPI) apparaissent aplatis, comme écrasés par les vacuoles adjacentes. Ce résultat est particulièrement intéressant car il met en évidence l'existence d'une convergence au sein des CESVV entre les phénotypes observés dans chacun des simples KOs, et leur forte synergie chez les DKO. Ces cellules pourraient donc constituer un site de convergence où la cystinosine et *PQLC2* coopèrent pour remplir une fonction essentielle au développement embryonnaire. Cette découverte marque une première étape importante dans la compréhension du phénomène de létalité synthétique, puisqu'elle nous permet de recentrer nos efforts sur un type cellulaire précis, ce qui n'exclut cependant pas qu'il puisse exister d'autres sites de convergence de la cystinosine et de *PQLC2.*

Ces résultats obtenus en IF ont été complémentés avec une approche moins spécifique mais permettant d'obtenir une bonne idée de la morphologie générale du tissu : une coloration histologique classique à l'hématoxyline-éosine (figure 29). Sur ces colorations, on peut distinguer la présence des vacuoles sur chacun des simple KO et sur le DKO avec la même progression dans la sévérité du phénotype par rapport au WT : DKO plus fort que *Ctns* KO, lui-même plus fort que *Pqlc2* KO. Ce marquage permet aussi de se rendre compte de l'ampleur du gonflement cytoplasmique et de la désorganisation du tissu.

Le docteur Isabelle Fanget, ingénieure dans l'équipe, a mené une expérience complémentaire à cette observation d'augmentation drastique de la taille des cellules : sur des sacs vitellins entiers en whole mount, elle a co-marqué LAMP1 et Claudin-7, un marqueur des jonction serrées. Ses résultats, présentés en annexe 5, montrent non seulement une perte de l'organisation cuboïde de l'épithélium chez le Ctns KO et le DKO, mais aussi une perturbation

sévère de ces jonctions serrées puisqu'on retrouve la Claudin-7 plus diffuse et présente dans certaines vacuoles élargies chez tous les mutants. Ces données vont dans le sens d'une perturbation sévère de la fonction d'épithélium absorptif de ce tissu.

Le phénotype vacuolaire étant très prononcé dans le sac vitellin des embryons DKO, on peut supposer que la fonction histiotrophique de ces cellules est fortement altérée et induit des défaillances de nutrition, ce qui impacte le développement embryonnaire. Il peut cependant paraitre surprenant que les CESVV des sacs vitellins cystinotiques, qui expriment pourtant ce phénotype vacuolaire de manière prononcée, semblent être capable de remplir leur fonction puisque les embryons se développent normalement. Une analyse fonctionnelle développée dans la partie suivante apportera des éléments de réponse.

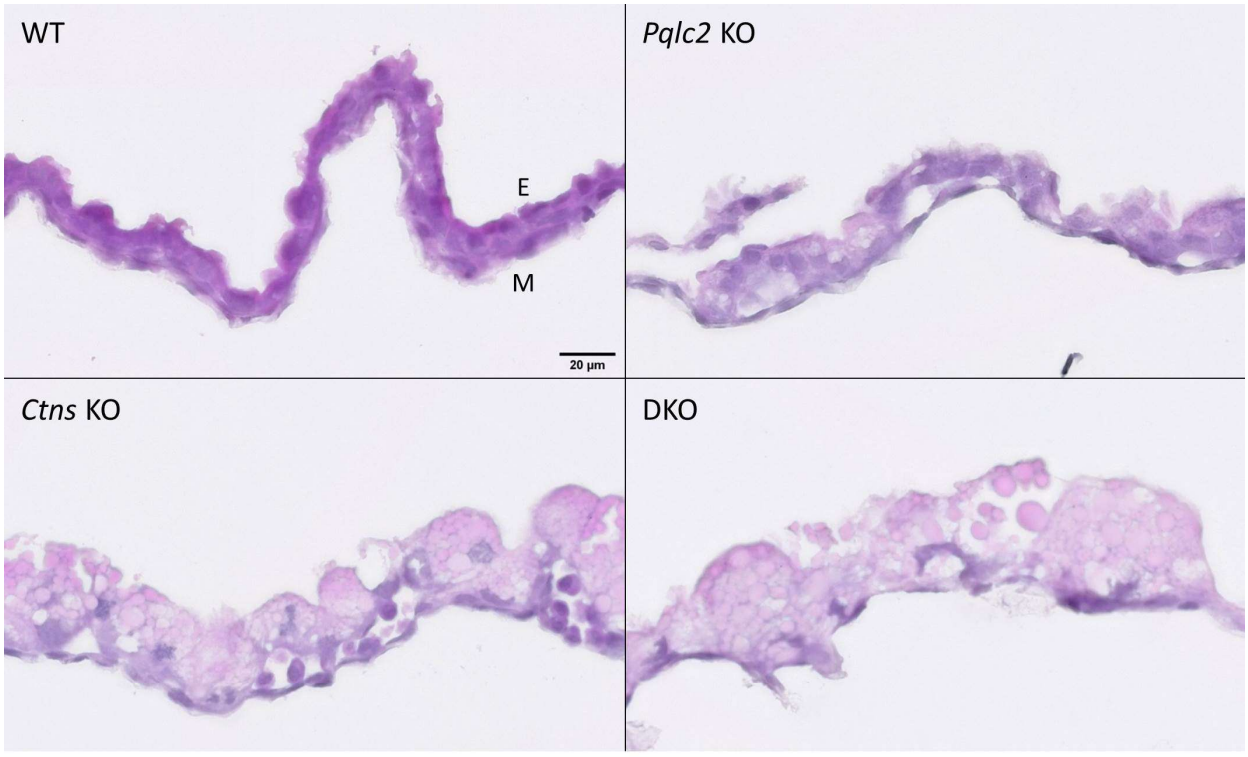


Figure 29 : Morphologie du sac vitellin viscéral d'embryons de souris dépourvus de *Ctns* et/ou de *Pqlc2*. Coloration hématoxyline-éosine de cryosections 5 µm de sacs vitellins d'embryons de souris WT et KO pour *Ctns* et/ou *Pqlc2*, au stade E10,5 de développement.
E = côté endoderme, M = côté mésoderme --- Imagerie : scanner de lames Zeiss Axioscan Z1

2) Autres défauts morphologiques

Les CESVV forment un épithélium absorptif hautement spécialisé, et expriment par conséquent un certain nombre de protéines nécessaires à cette fonction. Nous nous sommes donc intéressés à l'effet des mutations de *Ctns* et/ou *Pqlc2* sur d'autres aspects morphologiques de ces cellules. Au pôle apical des CESVV, on retrouve des microvillosités ayant pour but d'augmenter la surface d'échange avec les sécrétions endométriales. La détection du marqueur des microvillosités Ezrin sur coupes de sac vitellin ne semble pas indiquer d'effet net de nos mutations sur la formation de ces structures (figure 30).

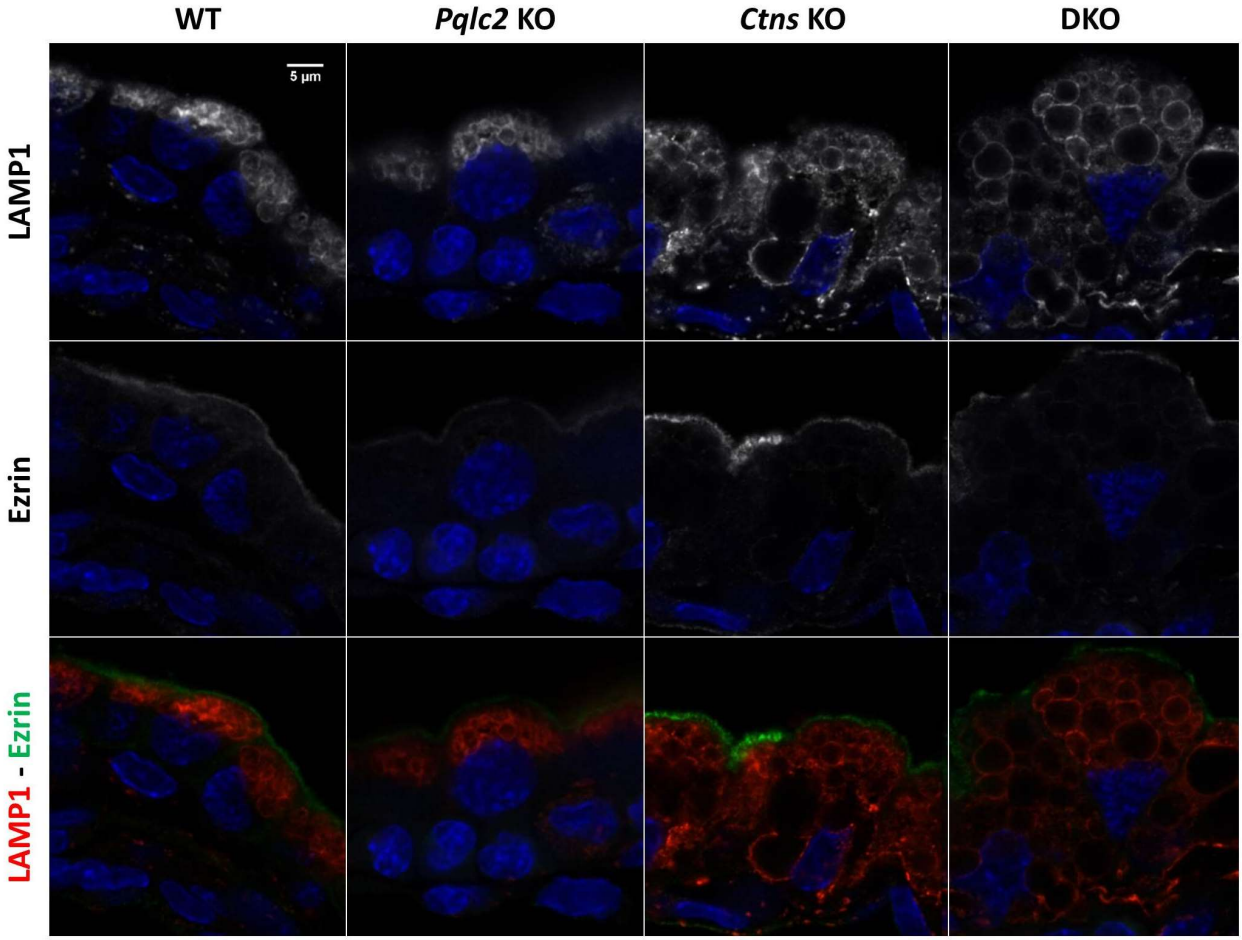


Figure 30 : Les microvillosités sont présentes au pôle apical des CESVV chez les WT et les KO de *Ctns* et *Pqlc2*. Détection par immunofluorescence du marqueur endolysosomal LAMP1 et du marqueur des microvillosités Ezrin sur cryosections de sacs vitellins fixés d'embryons E10,5 WT et KO pour *Pqlc2* et/ou *Ctns*.

Par ailleurs, une protéine dont il nous intéressait particulièrement de connaître la localisation chez nos mutants était la mégaline. Comme évoqué dans l'introduction, le complexe mégaline-cubuline(-amnionless) est indispensable pour l'internalisation d'un grand nombre de protéines dans les CESVV et sa perturbation provoque des malformations cérébrales des embryons.

La détection de la mégaline sur coupes de sac vitellin a été effectuée dans deux expériences indépendantes sur des échantillons biologiques différents ; dans les deux cas et malgré un signal faible, on retrouve bien une expression de la mégaline au pôle apical de ces cellules comme attendu, aussi bien chez les WT que chez les mutants.

Dans la première expérience, on distinguait une accumulation de mégaline dans les vacuoles élargies (données non montrées), mais ce résultat n'a pas pu être reproduit dans la deuxième expérience ; en revanche dans cette deuxième expérience le marquage mégaline semblait plus restreint au pôle apical dans les *Ctns* KO et les DKO que dans les *Pqlc2* KO et les WT (annexe 6) ce qui n'était pas le cas dans la première expérience. Il serait intéressant de répéter ces expériences afin de clarifier ce point.

On notera qu'il existe une boucle de régulation positive entre l'expression de *Lrp2* (gène codant pour la mégaline) et l'activation du complexe mTORC1 (Gleixner et al., 2014). Il serait intéressant de complémenter les expériences d'immunofluorescence avec une mesure quantitative de la transcription de *Lrp2* pour déterminer si oui ou non cette boucle de régulation transcriptionnelle par mTORC1 entre en jeu.

Enfin, nous avons cherché à voir si l'autophagie était impactée, et plus exactement si les vacuoles élargies avaient une composante autophagosomale. Ayant échoué à détecter LC3 sur tissus murins avec les anticorps que nous avions à disposition, nous avons utilisé la

protéine p62/SQSTM1 comme marqueur. Les résultats présentés en figure 31 n'ont pas permis d'observer de différence majeure entre les différents génotypes ; il faut noter que la grande variabilité du signal d'une région à l'autre des coupes de sac vitellin affaiblit les conclusions de cette analyse (il nous faudrait analyser un grand nombre de coupes).

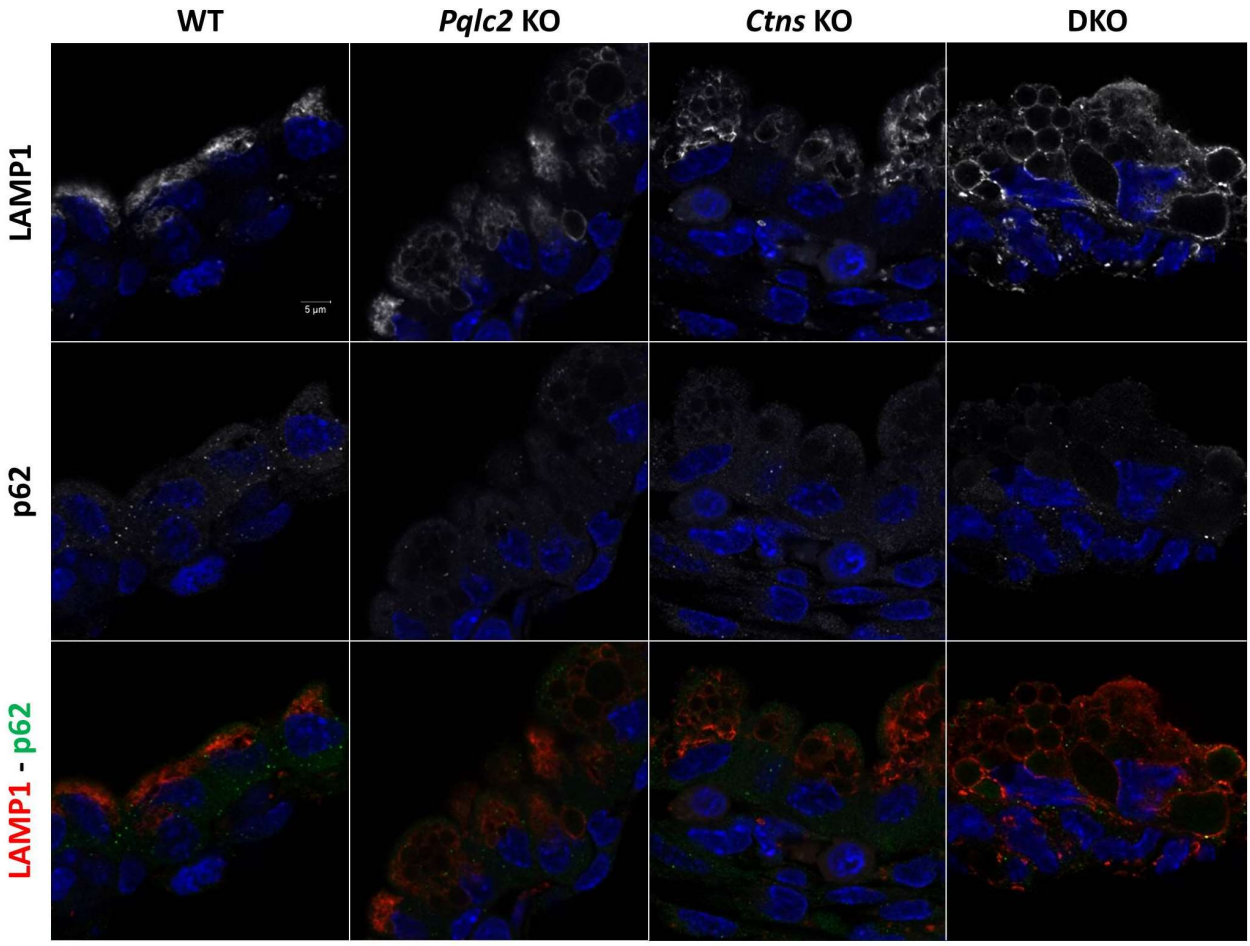


Figure 31 : Distribution de la protéine p62/SQSTM1 dans les CESVV d'embryons WT et KO pour *Ctns* et/ou *Pqlc2*. Détection par immunofluorescence du marqueur endolysosomal LAMP1 et de la protéine p62/SQSTM1 sur cryosections de sacs vitellins fixés d'embryons E10,5 WT et KO pour *Pqlc2* et/ou *Ctns*.

c) Altérations fonctionnelles du sac vitellin

Etant donné l'ampleur du phénotype causé par la perte de *Ctns* et/ou *Pqlc2* dans le sac vitellin des embryons, nous avons cherché à identifier si la fonction de ce tissu était perturbée. Pour cela, nous avons évalué la capacité des CESVV à internaliser et à dégrader les sécrétions maternelles.

1) Endocytose de matériel extracellulaire

Nous avons cherché à savoir si la voie d'endocytose est altérée dans les CESVV mutantes. Nous avons tiré parti de la possibilité de maintenir les sacs vitellins *ex vivo* pour un temps bref afin de réaliser des tests fonctionnels d'endocytose.

Un protocole qui nous avait été communiqué par le Dr. Renata Kozyraki consiste à incuber des sacs vitellins fraichement extraits avec de la transferrine couplée à un fluorochrome (ici, un AlexaFluor 488) afin de la visualiser en fluorescence. La transferrine est une protéine capable de se lier aux ions ferriques, et est cruciale pour l'internalisation de ce métal dans la cellule. Elle est endocytée par le récepteur mégaline-cubiline, mais n'est cependant pas dégradée et après avoir libéré les ions Fe^{2+} dans les endosomes, elle est recyclée à la surface de la cellule. Les résultats présentés en figure 32 montrent que des endosomes contenant la transferrine fluorescente sont bien présents dans les CESVV sauvages, mutants et doubles mutants. Il n'y a donc à priori pas de défaut d'internalisation ni de recyclage de cette protéine. Le signal semble plus conscrit au pôle apical dans les cellules *Ctns* et/ou *Pqlc2* KO, mais on ne peut pas

exclure qu'il s'agisse seulement d'un encombrement des vacuoles qui stoppent physiquement la progression des endosomes contenant la transferrine vers la direction basale.

Des tests fonctionnels d'endocytose ont été réalisés avec d'autres sondes fluorescentes, mais n'ont pas donné de résultats concluants. Une expérience de pulse-chase avec de l'albumine couplée à un fluorochrome avait été réalisée ; le temps de chasse choisit était de deux heures afin d'espérer visualiser un compartiment endocytaire tardif, mais après un tel délai la fluorescence avait complètement disparu. De même, une expérience d'internalisation de différents dextrans couplés à divers fluorochromes avait donné un signal faible et disparate. Il serait intéressant de réussir la mise au point de ces tests ; idéalement la meilleure approche serait de faire de la microscopie sur cellules vivantes et de suivre en temps réel le devenir des molécules internalisées. Travailler sur sac vitellin entier et vivant représente cependant un obstacle technique en raison de leur épaisseur (par rapport à des cryosections) et de leur relative fragilité.

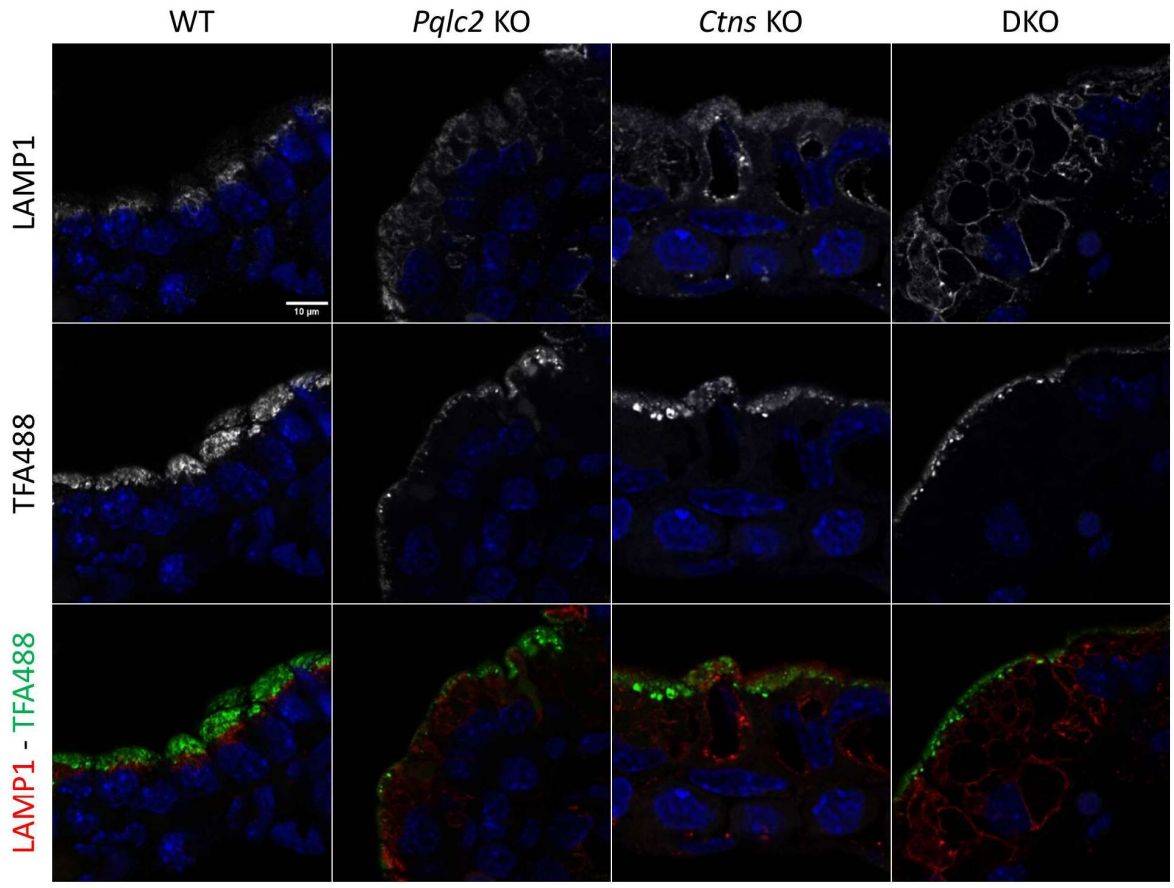


Figure 32 : Endocytose de la transferrine dans le sac vitellin viscéral d'embryons de souris dépourvus de *Ctns* et/ou de *Pqlc2*. Des sacs vitellins vivants ont été incubés dans du milieu DMEM (1% FBS) contenant 50 µg/mL de transferrine couplée à un AlexaFluor488 (TFA488) pendant 5 minutes à 37°C, 5% CO_2 puis fixés et utilisés pour réaliser des cryosections sur lesquelles LAMP1 a été immunomarqué.

2) Hydrolyse du matériel internalisé

Le sac vitellin produit des acides aminés en dégradant continuellement des protéines sécrétées par l'endométrium utérin. Parmi les protéines internalisées en grandes quantités par les CESVV, on compte la protéine circulante la plus abondante : l'albumine. Nous étions donc curieux de connaître son devenir dans la voie d'endocytose des cellules mutantes, d'autant plus que l'albumine est une source majeure de cystine dans les lysosomes des patients cystinotiques (Thoene & Lemons, 1982). La détection d'albumine maternelle par

immunofluorescence sur des sacs vitellins immédiatement fixés après extraction montre une accumulation prononcée de cette protéine dans le cytoplasme et certaines vacuoles des CESVV KO pour *Ctns* et/ou *Pqlc2* (figure 33 A). Cette accumulation est également visible en Western Blot (WB) (figure 33 B).

Cette accumulation massive peut être due soit à un défaut de protéolyse, soit à un problème d'acheminement et/ou de fusion des endosomes contant l'albumine avec les compartiments dégradatifs. Le fait que l'albumine soit assez peu présente dans les vacuoles, d'une part, et que les sacs vitellins *Ctns* KO ou *Pqlc2* KO (mais pas DKO) soient vraisemblablement capables de fournir à l'embryon des nutriments en quantités suffisantes, d'autre part, tend à indiquer qu'il s'agirait d'un problème d'acheminement plutôt qu'une altération de la fonction dégradative des lysosomes/vacuoles apicales. Cependant, le WB montre que l'albumine accumulée migre à des tailles très variables, suggérant qu'elle existe sous des formes clivées de manière incomplète, ce qui pointe vers un défaut de protéolyse dans ces cellules. Il nous faudrait pour clarifier cet aspect effectuer une mesure précise de la protéolyse lysosomale.

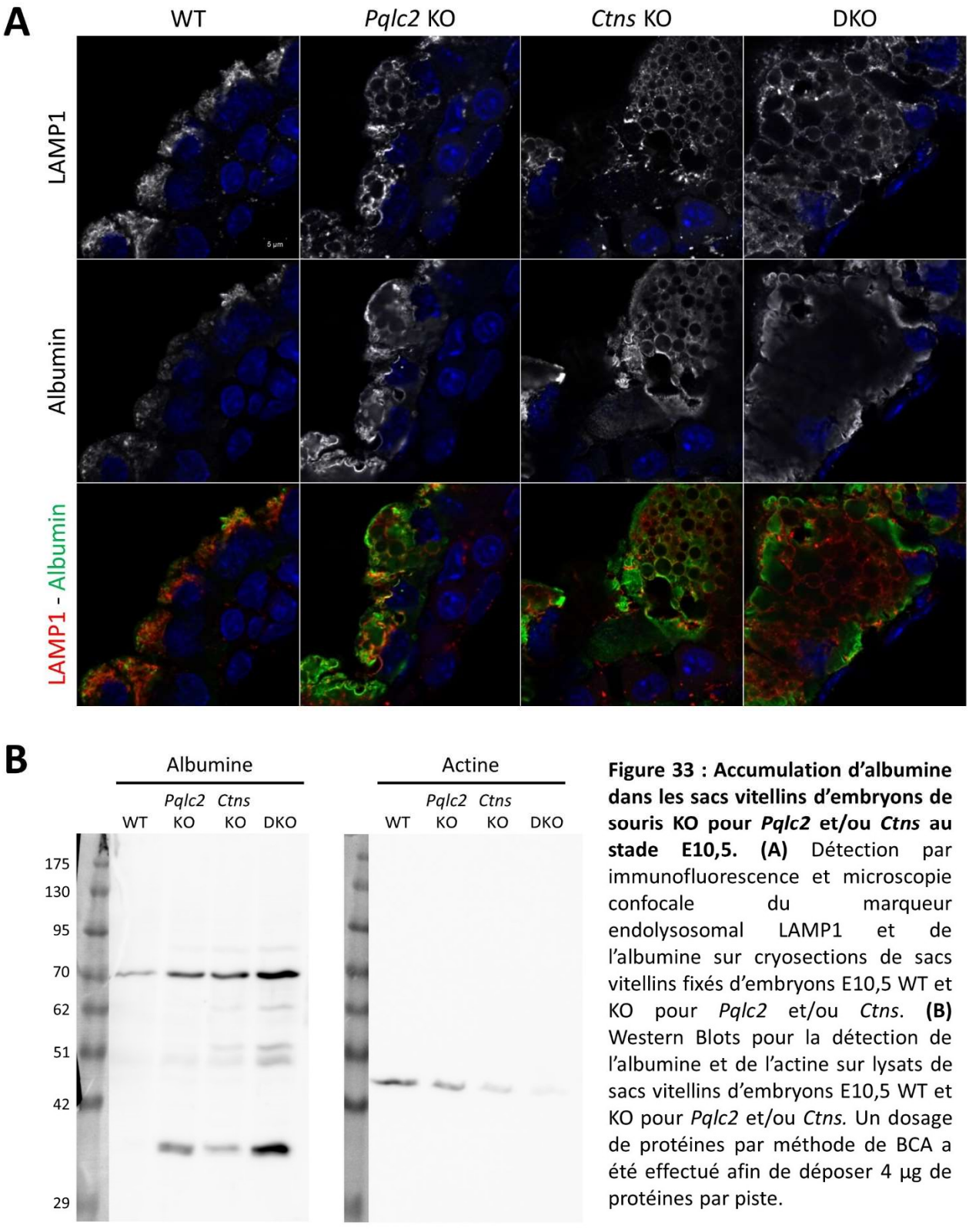


Figure 33 : Accumulation d'albumine dans les sacs vitellins d'embryons de souris KO pour *Pqlc2* et/ou *Ctns* au stade E10,5. (A) Détection par immunofluorescence et microscopie confocale du marqueur endolysosomal LAMP1 et de l'albumine sur cryosections de sacs vitellins fixés d'embryons E10,5 WT et KO pour *Pqlc2* et/ou *Ctns*. **(B)** Western Blots pour la détection de l'albumine et de l'actine sur lysats de sacs vitellins d'embryons E10,5 WT et KO pour *Pqlc2* et/ou *Ctns.* Un dosage de protéines par méthode de BCA a été effectué afin de déposer 4 µg de protéines par piste.

Le sac vitellin est par ailleurs capable de réaliser la transcytose d'immunoglobulines maternelles, qui serviront au futur nouveau-né de défense immunitaire en attendant qu'il développe les siennes propres (Arthur E. Wild, 1992). Ces glycoprotéines ne sont

normalement pas dégradées, mais le suivi de leur devenir dans la cellule peut nous renseigner sur l'état du trafic intracellulaire que l'on suppose très perturbé. De manière surprenante, on obtient un marquage qualitativement assez proche de celui obtenu avec l'albumine : une grande quantité d'immunoglobulines maternelles est accumulée dans ces CESVV, en partie dans les vacuoles élargies mais aussi dans le cytoplasme (figure 34 A). Le WB révèle là aussi un clivage partiel de ces protéines (figure 34 B).

De manière intéressante, une autre étude (Harris et al., 2015) a montré que le blocage de la protéolyse lysosomale par la leupeptine dans le sac vitellin d'embryons de rats induisait une accumulation forte d'albumine et d'immunoglobulines dans les sacs vitellins. Ceci nous conforte dans l'idée que la protéolyse lysosomale puisse être perturbée chez nos mutants.

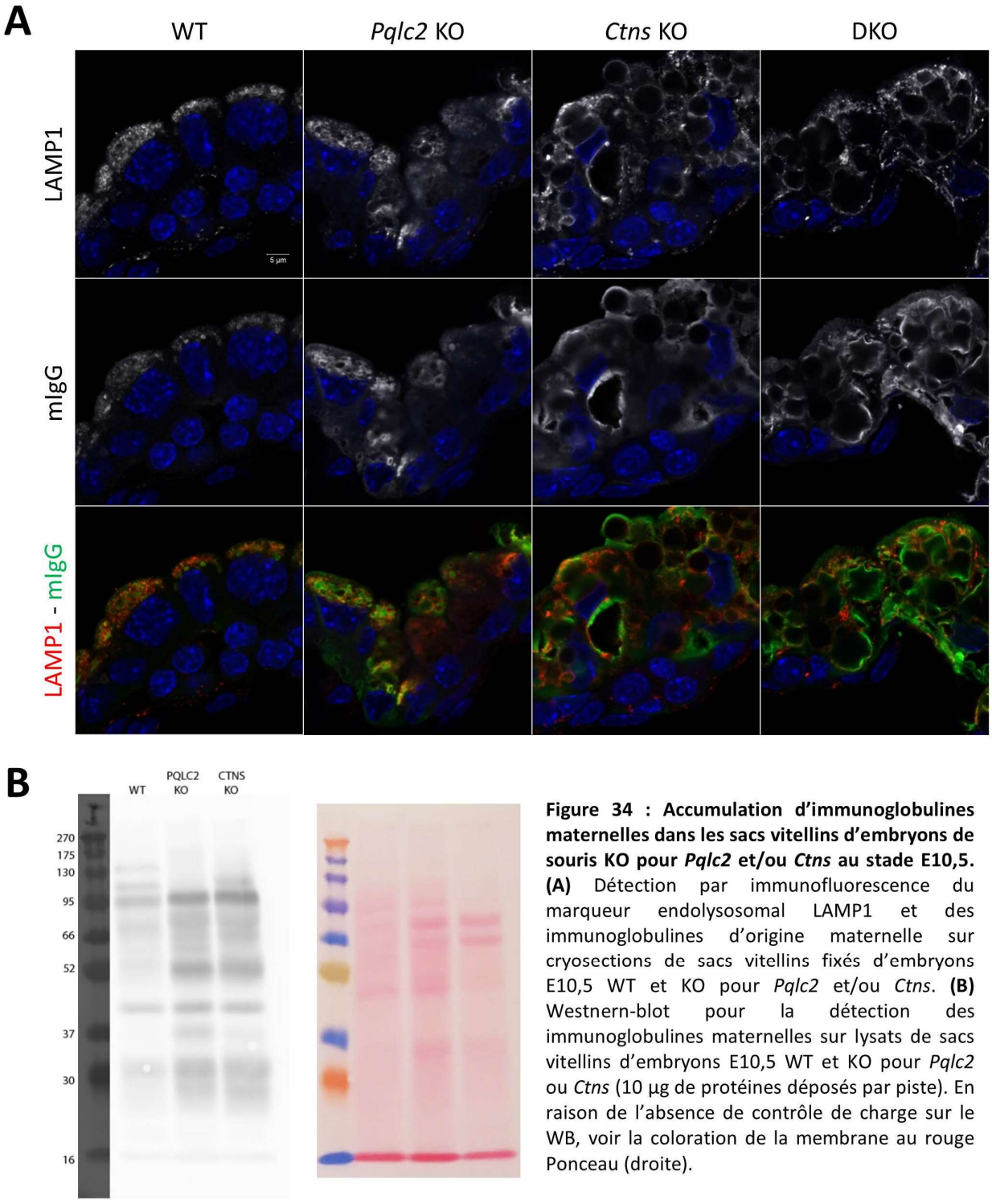


Figure 34 : Accumulation d'immunoglobulines maternelles dans les sacs vitellins d'embryons de souris KO pour *Pqlc2* et/ou *Ctns* au stade E10,5. **(A)** Détection par immunofluorescence du marqueur endolysosomal LAMP1 et des immunoglobulines d'origine maternelle sur cryosections de sacs vitellins fixés d'embryons E10,5 WT et KO pour *Pqlc2* et/ou *Ctns*. **(B)** Westnern-blot pour la détection des immunoglobulines maternelles sur lysats de sacs vitellins d'embryons E10,5 WT et KO pour *Pqlc2* ou *Ctns* (10 µg de protéines déposés par piste). En raison de l'absence de contrôle de charge sur le WB, voir la coloration de la membrane au rouge Ponceau (droite).

d) Conclusions de l'étude du sac vitellin

On observe un défaut synthétique du double KO de *Ctns* et *Pqlc2* dans les compartiments endolysosomaux des CESSV, ce qui établit ces cellules comme un lieu majeur de l'interaction fonctionnelle entre ces deux transporteurs lysosomaux.

Initialement, notre hypothèse prévoyait que l'absence de *Ctns* et de *Pqlc2* puisse conduire à un défaut d'approvisionnement de leurs substrats respectifs à l'embryon (cystine d'un part, acides aminés cationiques d'autre part). Mais on observe chez les KO des défauts importants de la voie d'endocytose et de dégradation des protéines internalisées. Ces résultats tendent à indiquer que la cystinosine et de *PQLC2* jouent un rôle inattendu dans le contrôle de ces processus.

A ce stade de l'étude, il n'est pas possible de déterminer si ce rôle dépend de l'apport de leurs substrats dans le cytoplasme des CESVV, ou si ces protéines jouent un rôle direct dans des voies de signalisation cellulaires influençant l'endocytose et la protéolyse lysosomale. Le phénotype que l'on observe dans les CESVV pourrait aussi être en réalité une conséquence secondaire d'un autre processus dérégulé par la perte de *Ctns* et/ou *Pqlc2*. Il serait donc intéressant de clarifier les mécanismes moléculaires qui entrent en jeu dans l'interaction génétique entre ces deux transporteurs.

C) Plusieurs approches mécanistiques

a) Approche réductionniste sur un modèle cellulaire

1) Modèle cellulaire HAP1

Les sacs vitellins fixés ou lysés permettent d'obtenir des informations très intéressantes sur l'état basal des cellules de ce tissu, et la possibilité de les maintenir *in vitro* pendant quelques heures permet de tester des traitements pharmacologiques aigus. En revanche, comme il est inenvisageable de les maintenir en culture sur une durée prolongée (étant donné que le phénotype vacuolaire disparait), cela exclut les traitements pharmacologiques plus longs, ou les approches génétiques d'expression de protéines exogènes. Pour cela, il faut effectuer les traitements *in vivo* mais sans pouvoir présumer de la biodisponibilité de composés vis-à-vis du sac vitellin.

Afin d'accélérer l'étude des rôles cellulaires de la cystinosine et de PQLC2, et d'envisager les approches susmentionnées, nous avons utilisé une approche réductionniste sur un modèle de cellules immortalisées, les HAP1. Ces cellules, dérivées d'une leucémie myéloïde humaine, présentent la particularité d'être quasiment haploïdes, ce qui facilite grandement l'inactivation de gènes par CRISPR-Cas9. Cependant, leur diamètre d'environ 11 µm (en moyenne) et leur faible étalement limite la qualité des observations microscopiques comme l'immunofluorescence, par rapport à des lignées communément utilisées comme des cellules HeLa. Une doctorante de notre équipe, Océane Guelle, est parvenue à augmenter l'étalement

des cellules HAP1 en les ensemençant sur une matrice de collagène, ce qui a permis de faciliter leur utilisation en microscopie.

Nous avons commandé auprès du distributeur Horizon Discovery des cellules HAP1 KO pour CTNS et PQLC2, ainsi que des cellules doublement KO pour CTNS et PQLC2, avec les cellules WT parentales (voir matériel et méthodes). On notera que les clones DKO sont viables. Nous avons aussi commandé des cellules KO pour C9orf72, membre du complexe C9orf72-SMCR8-WDR41 (CSW) recruté aux lysosomes par PQLC2 lors d'une carence en acides aminés, afin de pouvoir éventuellement discriminer un effet propre de PQLC2 d'un effet indirect de CSW.

Ces différentes lignées cellulaires ne présentent pas de différences en termes de vitesse de pousse ; on note cependant que les cellules C9orf72 KO sont plus petites que les autres, ce qui peut s'expliquer par la perte de l'effet activateur de cette protéine sur mTORC1 (J. Amick et al., 2016). Les cellules KO pour PQLC2 et/ou CTNS ont été soumises à des tests additionnels mesurant leur viabilité lors d'un stress cellulaire ; ces tests n'ont pas révélé de différences robustes d'un génotype par rapport à l'autre. Une synthèse de ces résultats est présentée en annexe 9.

2) Altérations des compartiments lysosomaux chez les KO Pqlc2 et DKO

Compte tenu du phénotype de vacuolisation des compartiments endolysosomaux observés dans les CESVV des sacs vitellins *Ctns* KO et/ou *Pqlc2* KO, nous nous sommes demandé si ce phénomène pouvait se manifester également dans les cellules HAP1. Nous avons donc là aussi marqué la protéine LAMP1 des cellules HAP1 et observé que dans les clones PQLC2 KO et DKO,

les lysosomes ont tendance à se regrouper en amas (figure 35 A). Cela ne semble pas être le cas pour les cellules CTNS KO, ce qui ne va pas dans le sens des observations d'autres groupes qui notent une localisation périnucléaire marquée des lysosomes dans les cellules cystinotiques (Festa et al., 2018; Ivanova et al., 2015).

Nous avons cherché à confirmer l'observation faite sur les cellules PQLC2 KO en employant une approche différente. Des cellules HAP1 WT et PQLC2 KO sont incubées pendant une nuit dans du milieu complet contenant un dextran (10000 MW) couplé à un fluorochrome, qui va s'accumuler dans tous les compartiments de la voie d'endocytose, puis 1 heure de chasse dans du milieu sans dextran pour ne visualiser que les compartiments endocytaires tardifs (endosomes tardifs et endolysosomes). Les résultats, présentés dans la figure 35 B, montrent là aussi un regroupement de ces compartiments tardifs qui forment des masses contenant une quantité importante de signal.

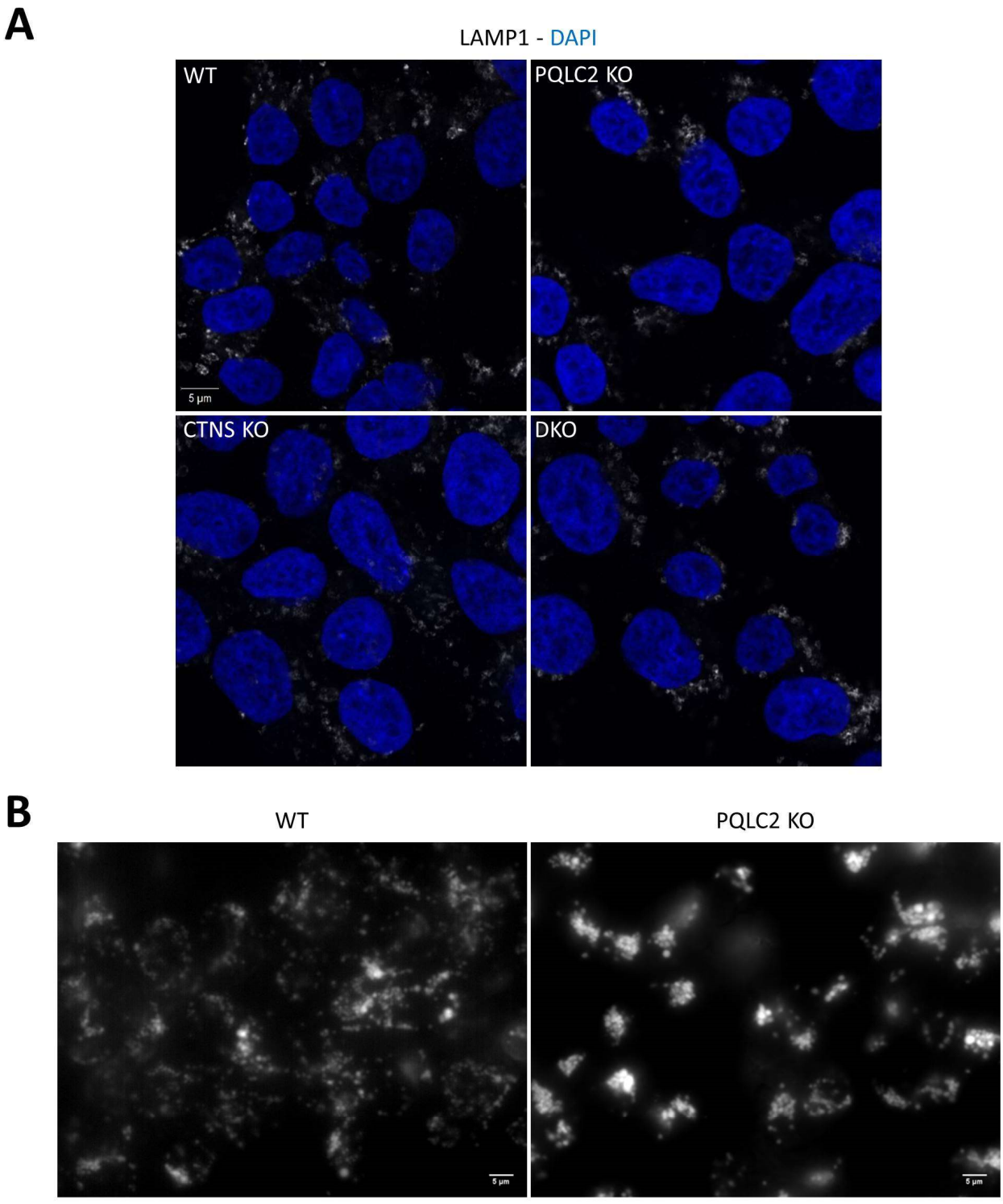


Figure 35 : Les cellules HAP1 dépourvues de PQLC2 présentent une clusterisation de leurs compartiments endolysosomaux. (A) Détection par immunofluorescence et microscopie confocale de la protéine de membrane endolysosomale LAMP1 sur cellules HAP1 fixées WT ou KO pour PQLC2 et/ou CTNS. **(B)** Acquisition au microscope à épifluorescence de cellules HAP1 vivantes (WT ou PQLC2 KO) après un protocole de pulse-chase avec un dextran couplé à un fluorochrome AlexaFluor568, utilisé comme marqueur des compartiments tardifs d'endocytose.

Ce résultat est intéressant puisque l'on retrouve dans ces cellules un effet de la perte de fonction de PQLC2 sur les (endo)lysosomes, mais qui se manifeste différemment par rapport aux CESVV. Dans les expériences ci-après nous nous sommes donc majoritairement concentrés sur la description des cellules PQLC2 KO, à la fois parce qu'elles présentent un phénotype au niveau des (endo)lysosomes, mais aussi pour essayer de mieux comprendre les mécanismes cellulaires affectés dans les cellules endodermales du sac vitellin. L'absence apparente d'effet dans les HAP1 CTNS KO pourrait être due à une accumulation insuffisante de cystine dans leurs lysosomes pour induire un phénotype visible.

Nous avons également regardé si des défauts additionnels étaient détectables dans ces cellules : nous avons marqué les endosomes précoces (Sorting Nexin 1) et le cytosquelette (actine/tubuline) mais n'avons pas détecté d'anomalies évidentes (voir annexe 10).

3) Régulation positive de protéines impliquées dans l'autophagie sélective chez le KO Pqlc2

3.1) Pourquoi un lien entre PQLC2 et l'autophagie sélective ?

L'observation du phénotype de vacuolisation des compartiments LAMP1 dans les CESVV *Pqlc2* KO représente une opportunité intéressante pour tenter d'identifier des rôles de ce transporteur dans la physiologie cellulaire. En effet, en comparaison à la cystinosine, on connait mal les rôles de PQLC2, hormis l'étude récente qui décrit son rôle dans le recrutement du complexe C9orf72 aux lysosomes, et dans la réactivation de mTORC1 en réponse aux acides aminés cationiques (Joseph Amick et al., 2020).

Il est également important de garder à l'esprit les spécificités de la voie d'endocytose dans les CESVV. Dans ces cellules, les vésicules d'endocytose contenant les protéines à dégrader ne fusionnent pas avec la membrane des vacuoles apicales (comme c'est le cas classiquement entre les endosomes et les lysosomes). Ces endosomes sont en fait internalisés dans les vacuoles par un mécanisme similaire à la microautophagie (Wada et al., 2013) : la membrane vacuolaire s'invagine et les endosomes sont internalisés sous forme de vésicules intraluminales à double membrane. Ils sont ensuite dégradés dans la lumière à l'aide de lipases acides.

Nous avons donc recherché des liens entre la microautophagie et la disponibilité des acides aminés dans la littérature. Nous avons identifié une étude récente d'un équipe norvégienne montrant qu'en cas de carence nutritionnelle, la cellule dégrade rapidement par microautophagie certaines protéines, dont des récepteurs d'autophagie sélective et des ubiquitines ligases (Mejlvang et al., 2018). Cette réponse se met en place rapidement, avant l'induction de la macroautophagie non sélective et elle est indépendante de l'activité de mTORC1. Elle a pour but probable d'empêcher la dégradation massive des cibles de l'autophagie sélective telles que les mitochondries lors de la réponse macroautophagique à une carence nutritionnelle.

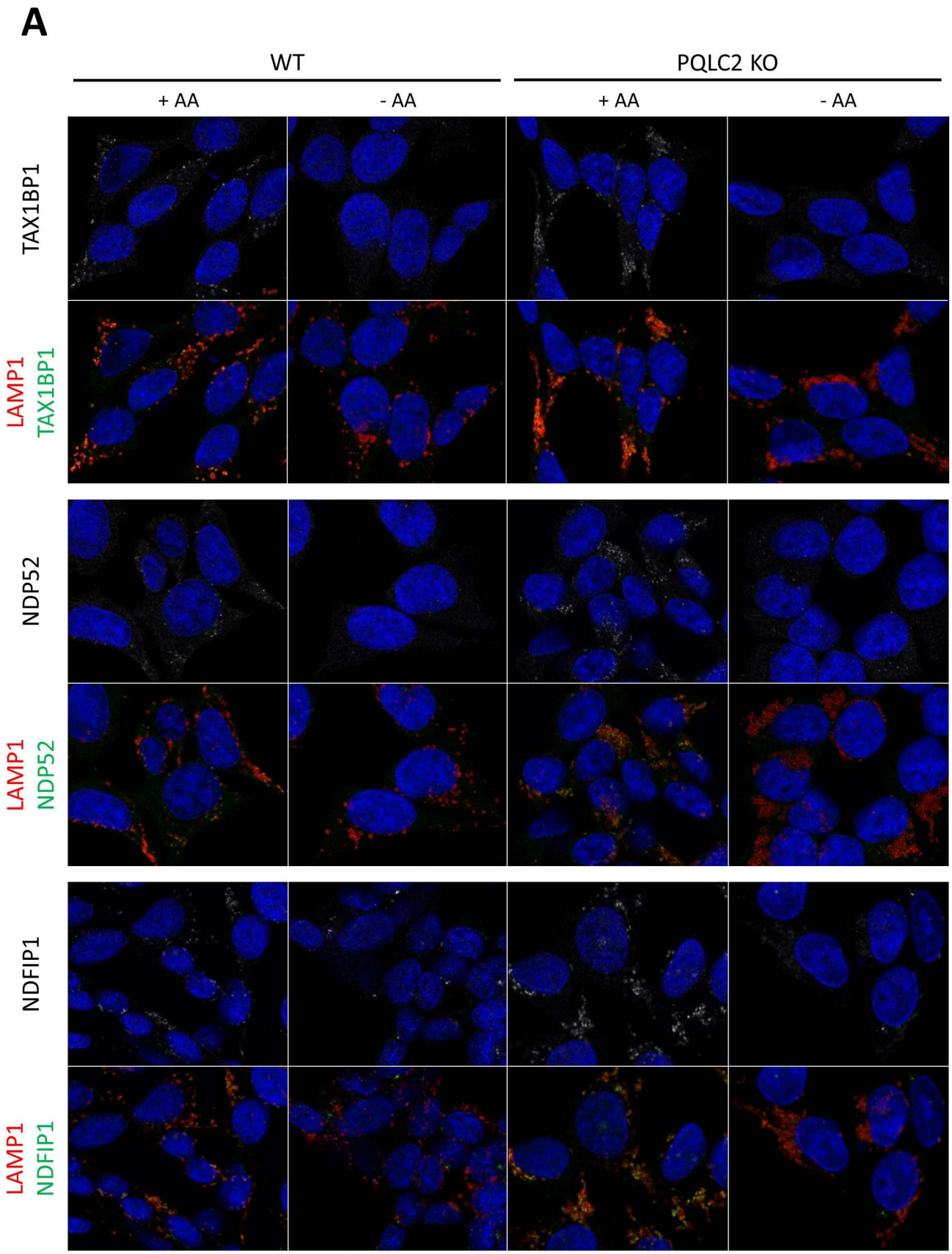
Nous avons donc émis l'hypothèse que PQLC2, du fait de son rôle de senseur d'acides aminés cationiques, pourrait posséder un rôle dans la mise en place ou l'exécution de ce mécanisme de microautophagie. Si son rôle dans ce processus était avéré dans les cellules HAP1, cela permettrait d'envisager une perturbation de l'internalisation des endosomes dans les vacuoles apicales comme piste possible pour expliquer la dilatation de ces vacuoles dans les CESVV déficientes en *PQLC2*. Les cellules C9orf72 KO constituent par ailleurs un outil

intéressant pour estimer si les rôles joués par PQLC2 dépendent ou non de sa capacité à recruter le complexe C9orf72-SMCR8-WDR41 à la surface des lysosomes.

3.2) Les protéines TAX1BP1, NDP52, NDFIP1 et p62 s'accumulent en l'absence de PQLC2

Nous avons donc cherché à visualiser le phénomène de dégradation rapide de protéines impliquées dans l'autophagie sélective décrite par le groupe de Terje Johansen (Mejlvang et al., 2018) en comparant la réponse à une carence transitoire en acides aminés de cellules HAP1 Pqlc2 KO et de HAP1 WT. Nous nous sommes intéressés de plus près aux protéines dont les niveaux sont décrits dans cet article comme étant fortement diminués : les récepteurs de l'autophagie sélective TAX1BP1 et NDP52/CALCOCO2, ainsi que l'ubiquitine-ligase NDFIP1/NEDD4.

Les résultats présentés en figure 36 indiquent que quel que soit le génotype, le signal associé à ces protéines chute fortement après 2 heures de carence en acides aminés. PQLC2 n'est donc pas impliqué dans cette réponse rapide à la carence. Dans les deux génotypes, la localisation de TAX1BP1, NDFIP1 et NDP52 est la même : ils sont situés majoritairement à proximité immédiate de compartiments positifs pour LAMP1. En revanche on voit que, pour chacune des trois protéines étudiées, les cellules KO accumulent une quantité de signal plus importante que les cellules WT en conditions basales, c'est à dire lorsque les acides aminés sont présents. PQLC2 semble donc réguler le niveau basal de plusieurs protéines impliquées dans les autophagies sélectives de divers organites.


A
WT
PQLC2 KO
+ AA
- AA
+ AA
- AA
TAX1BP1
LAMP1
TAX1BP1
NDP52
LAMP1
NDP52
NDFIP1
LAMP1
NDFIP1

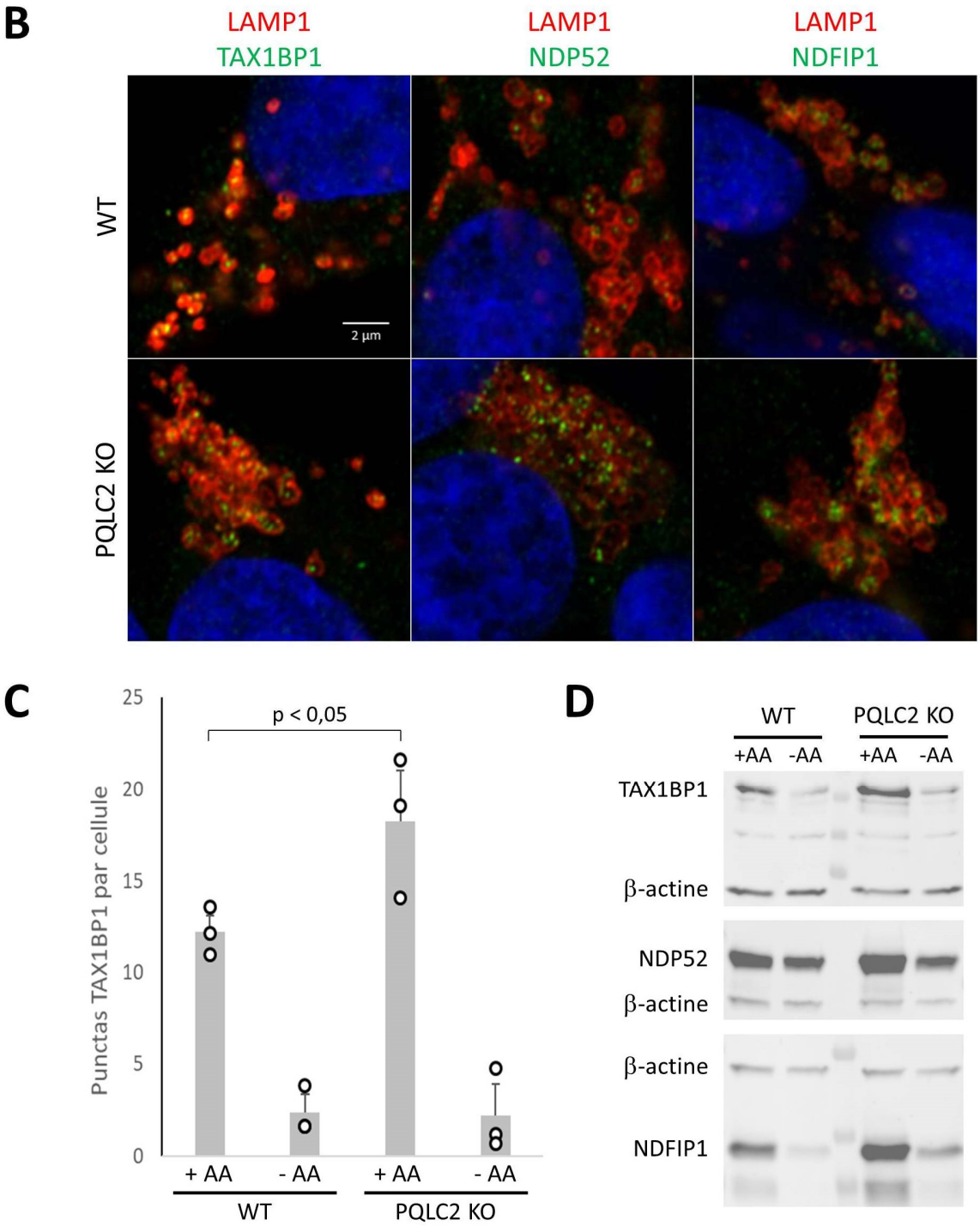


Figure 36 : Le KO de *Pqlc2* induit une accumulation de récepteurs d'autophagie sélective. (A) Co-immunofluorescence et microscopie confocale pour la détection de LAMP1 et des récepteurs de l'autophagie sélective TAX1BP1 ou NDP52 ou de l'ubiquitine-ligase NDFIP1 sur cellules HAP1 WT ou KO pour PQLC2, carencées ou non en acides aminés. **(B)** Localisation à proximité immédiate des (endo)lysosomes des punctas TAX1BP1, NDP52 et NDFIP1 dans les cellules non carencées en acides aminés. **(C)** Quantification du nombre de punctas TAX1BP1 par cellule, réalisée avec les outils de segmentation du logiciel de traitement d'images IMARIS (N = 3 champs par condition, acquis lors d'une même expérience ; histogramme = valeur moyenne ; barres d'erreur = écarts moyens ; test statistique utilisé = test de Student). **(D)** Western Blots réalisés par Océane Guelle (doctorante au laboratoire) et utilisés avec autorisation, montrant l'accumulation des protéines TAX1BP1, NDP52 et NDFIP1 dans les cellules PQLC2 KO par rapport aux cellules WT, lorsque les acides aminés sont présents. AA = acides aminés

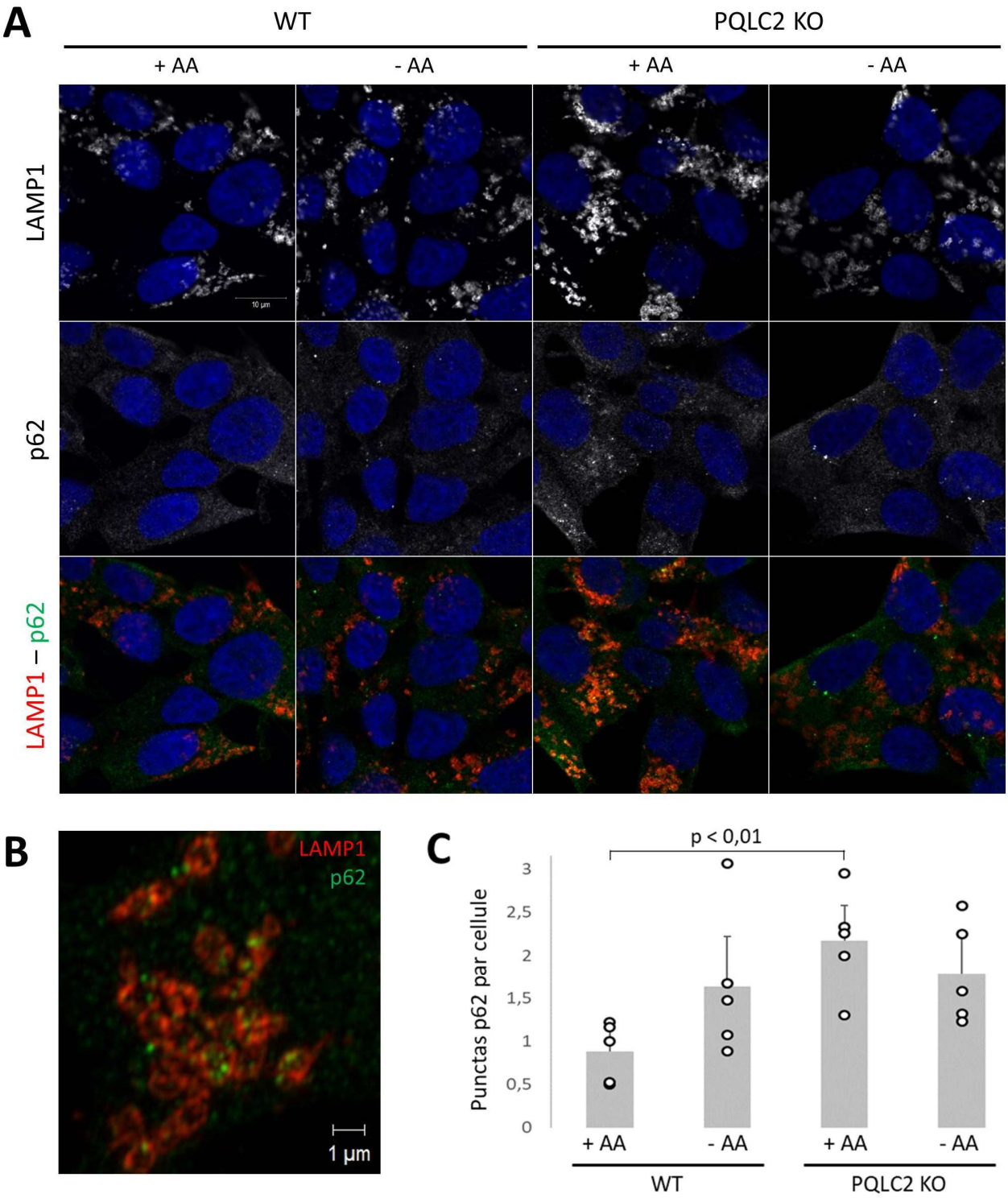


Figure 37 : L'absence de PQLC2 induit une accumulation de punctas p62 associés à des compartiments endolysosomaux, dans les cellules HAP1 non carencées en acides aminés. (A) Détection par immunofluorescence et microscopie confocale de LAMP1 et p62 sur cellules HAP1 WT ou KO pour PQLC2, en présence d'acides aminés (milieu complet) ou en leur absence (EBSS + sérum dialysé). **(B)** Zoom sur une région riche en punctas p62 d'une cellule PQLC2 KO non carencée illustrant la relation spatiale entre les punctas p62 et les (endo)lysosomes. **(C)** Quantification du nombre de punctas p62 par cellule, réalisée avec les outils de segmentation du logiciel de traitement d'images IMARIS (N = 5 champs par condition, acquis lors d'une même expérience ; histogramme = valeur moyenne ; barres d'erreur = écarts moyens ; test statistique utilisé = test de Student). AA = acides aminés

Dans leur étude, (Mejlvang et al., 2018) rapportent que parmi les protéines dégradées rapidement par microautophagie en cas de carence, on compte aussi la protéine adaptatrice p62/SQSTM1. p62 possède un rôle crucial dans l'exécution de l'autophagie de cibles diverses, sa versatilité lui étant conférée par sa capacité à se lier à la protéine du phagosome LC3 ainsi qu'à de nombreuses cibles de l'autophagie. Elle reconnait notamment des modifications post-traductionnelles telles que l'ubiquitinylation mais aussi des modifications plus atypiques comme l'arginylation par exemple. Ainsi, p62 va être impliquée dans la macroautophagie sélective induite par la carence mais aussi dans certaines autophagies sélectives telles que l'agréphagie, la mitophagie et la xénophagie (Katsuragi, Ichimura, & Komatsu, 2015). Nous nous sommes donc également intéressés à cette protéine.

La carence en acides aminés induit la formation d'un signal p62 punctiforme intense, qui correspond aux sites d'assemblage des autophagosomes (figure 37 A). Ce signal ne semble pas différer entre les cellules WT et les cellules PQLC2 KO : cela suggère que la mutation n'a pas d'effet sur les premières étapes de l'adaptation cellulaire à la carence. Dans les cellules HAP1 sauvages en conditions basales (milieu riche), le marquage p62 est essentiellement cytosolique. Dans les cellules dépourvues de PQLC2, on observe en conditions basales la présence de nombreux punctas p62 de taille et d'intensité variables (figure 37 A et C).

En revanche, les punctas induits par la perte de PQLC2 en conditions basales semblent différer de ceux induits par la carence en acides aminés. En effet, dans le premier cas, ils sont majoritairement localisés à proximité des compartiments (endo)lysosomaux positifs pour LAMP1 (figure 37 B). Leur localisation est donc similaire à celles de TAX1BP1, NDFIP1 et NDP52 dans ces cellules KO, ce qui indiquerait que la fonction de PQLC2 perturberait plutôt le rôle de p62 dans les autophagies sélectives. Néanmoins, nous ne savons pas à l'heure actuelle de

quelle(s) autophagie(s) sélective(s) précise(s) il s'agit. Nous avons co-marqué p62 et l'ubiquitine (modification post-traductionnelle la plus courante des cibles de l'autophagie sélective) mais n'avons pas trouvé de co-localisation (figure 38).

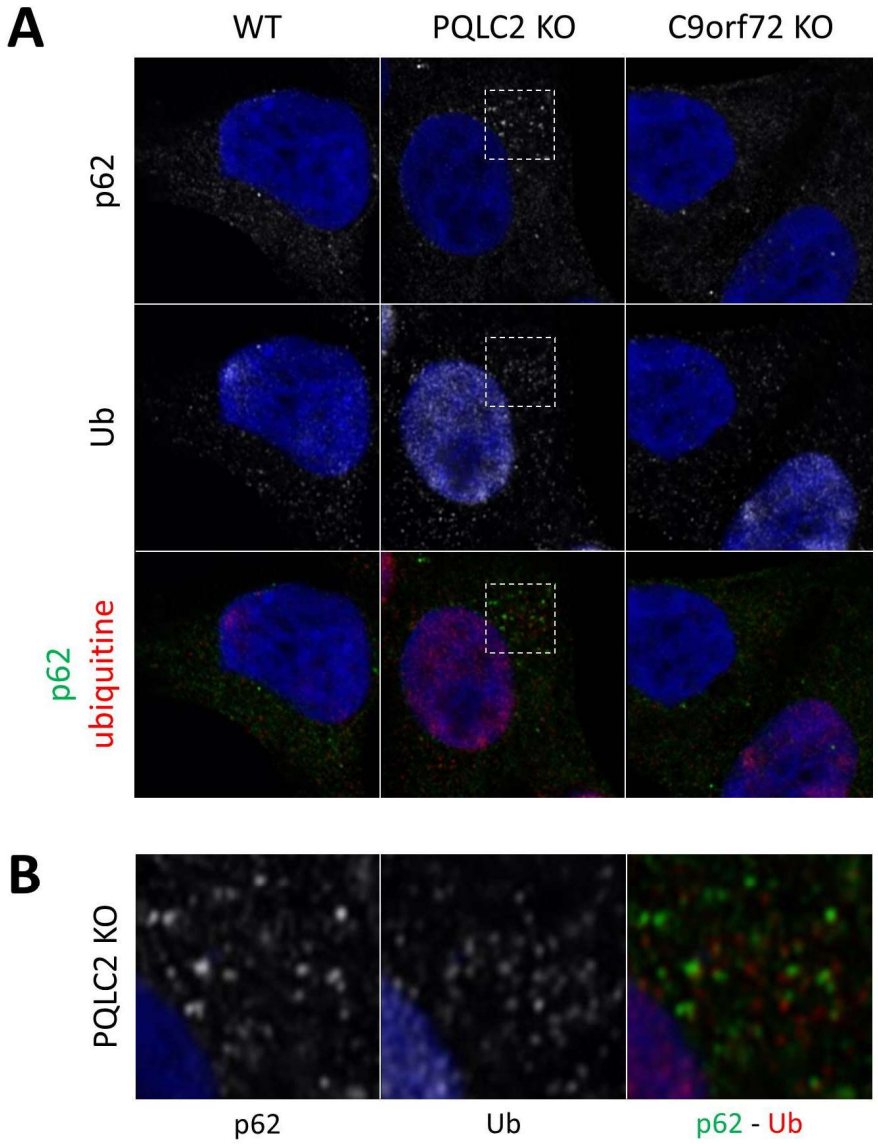


Figure 38 : Les punctas p62 ne colocalisent pas avec l'ubiquitine. (A) Détection par immunofluorescence et microscopie confocale de l'ubiquitine (Ub) et p62 sur cellules HAP1 WT ou KO pour PQLC2. **(B)** Zoom sur la région encadrée en **(A)** pour illustrer la localisation différente du signal p62 et du signal ubiquitine.

Par ailleurs, la détection par immunofluorescence de la protéine LC3 (figure 39) révèle une distribution de cette protéine très similaire à celle de p62, avec une accumulation lysosomale chez les PQLC2 KO. L'intérêt particulier de ce marquage est qu'en cas de carence en acides

aminés, on parvient à distinguer des structures annulaires correspondant aux sites de formation des autophagosomes, et ces structures possèdent un diamètre environ deux fois plus important que celles qui s'accumulent dans les cellules PQLC2 KO non carencées (figure 39).

En résumé, les expériences menées sur ce modèle de cellules HAP1 montrent que l'inactivation de PQLC2 régule positivement le taux basal de diverses protéines impliquées dans des autophagies sélectives : TAX1BP1, NDP52 et NDFIP1. C'est aussi le cas de la protéine p62, qui est impliquée à la fois dans les macroautophagies non sélectives et sélectives ; les données microscopiques suggèrent plutôt un lien dans ces derniers processus. En revanche, la réponse à la carence en acide aminés qui consiste pour la cellule à dégrader rapidement ces protéines par microautophagie ne semble pas affectée par l'inactivation de Pqlc2.

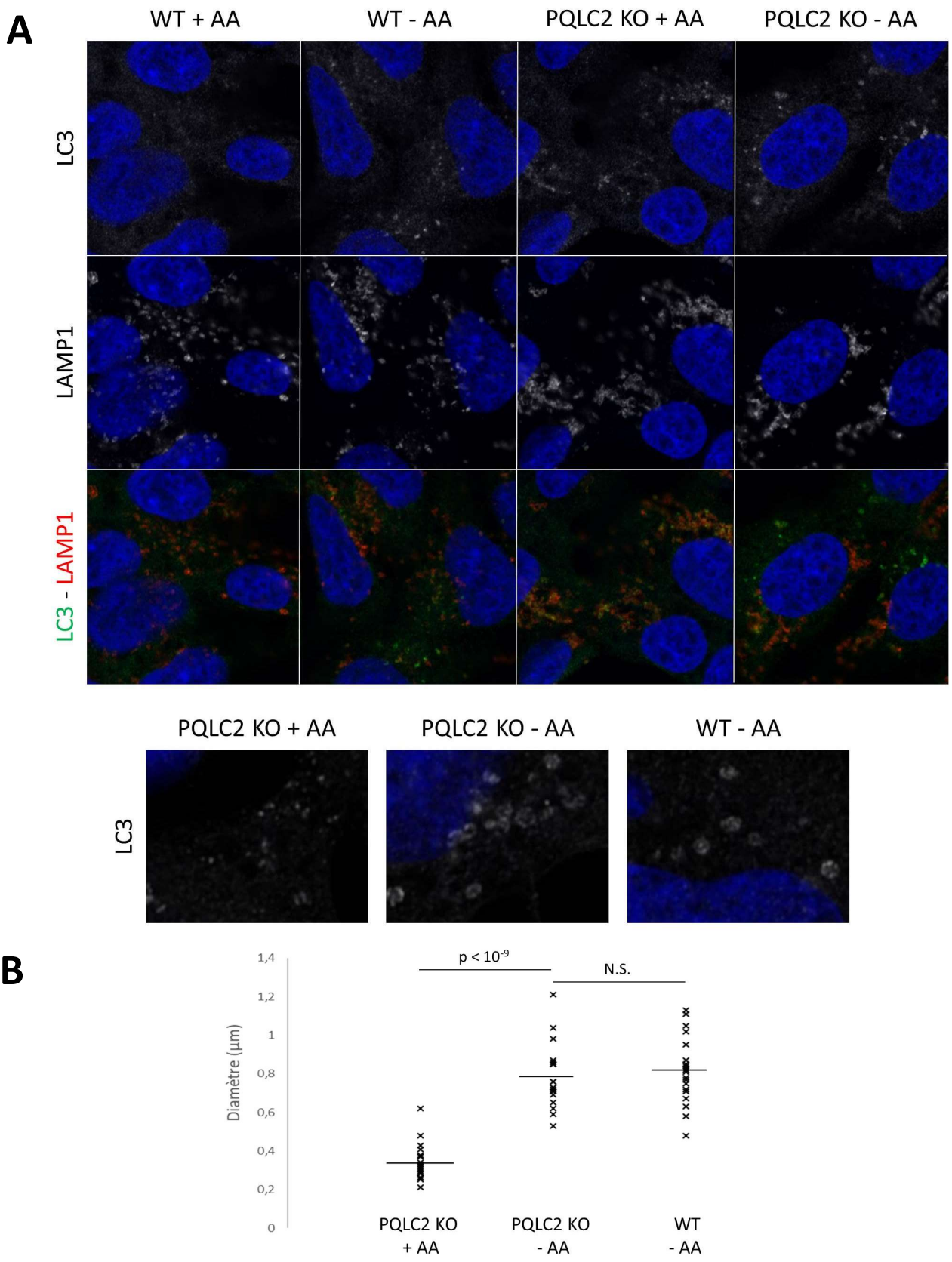


Figure 39 : Les compartiments positifs pour LC3 accumulés dans les cellules PQLC2 KO non carencées sont plus petits que ceux induits par la carence. (A) Détection par immunofluorescence et microscopie confocale des protéines LC3 et LAMP1 sur cellules HAP1 WT ou PQLC2 KO carencées ou pas en AA pendant 2 heures. **(B)** Mesure de la taille des structures exprimant LC3 (N = 20 par condition).
Traitements et immunofluorescence réalisés par Océane Guelle (doctorante)

3.3) Le complexe C9orf72 joue-t-il un rôle dans l'accumulation de ces protéines ?

On sait depuis peu que la localisation lysosomale du complexe formé par C9orf72, SMCR8 et WDR41 (désigné ci-après par 'complexe C9orf72') est dépendante de son interaction avec PQLC2 (Joseph Amick et al., 2020). Tous les rôles de ce complexe au lysosome ne sont pas encore connus, mais diverses études ont rapporté que la perte de fonction de C9orf72 était associée à des défauts d'autophagie (voir introduction). Nous nous sommes donc demandé si le phénotype induit par la perte de PQLC2 reflétait ou non la perte de son rôle dans le recrutement lysosomal du complexe C9orf72. Nous avons donc cherché à voir si les cellules dépourvues de C9orf72 présentaient un phénotype similaire. Les résultats présentés en figure 40 montrent qu'en conditions basales, les cellules C9orf72 ne montrent pas de signal NDP52 augmenté par rapport au sauvage. De même, la figure 41 montre qu'il n'y a pas d'augmentation du signal p62 localisé aux lysosomes chez les C9orf72 KO non carencées ; l'activation de l'autophagie induite par la carence ne semble également pas perturbée. La perte de C9orf72 n'altère pas non plus les endosomes précoces ni le cytosquelette (annexe 10).

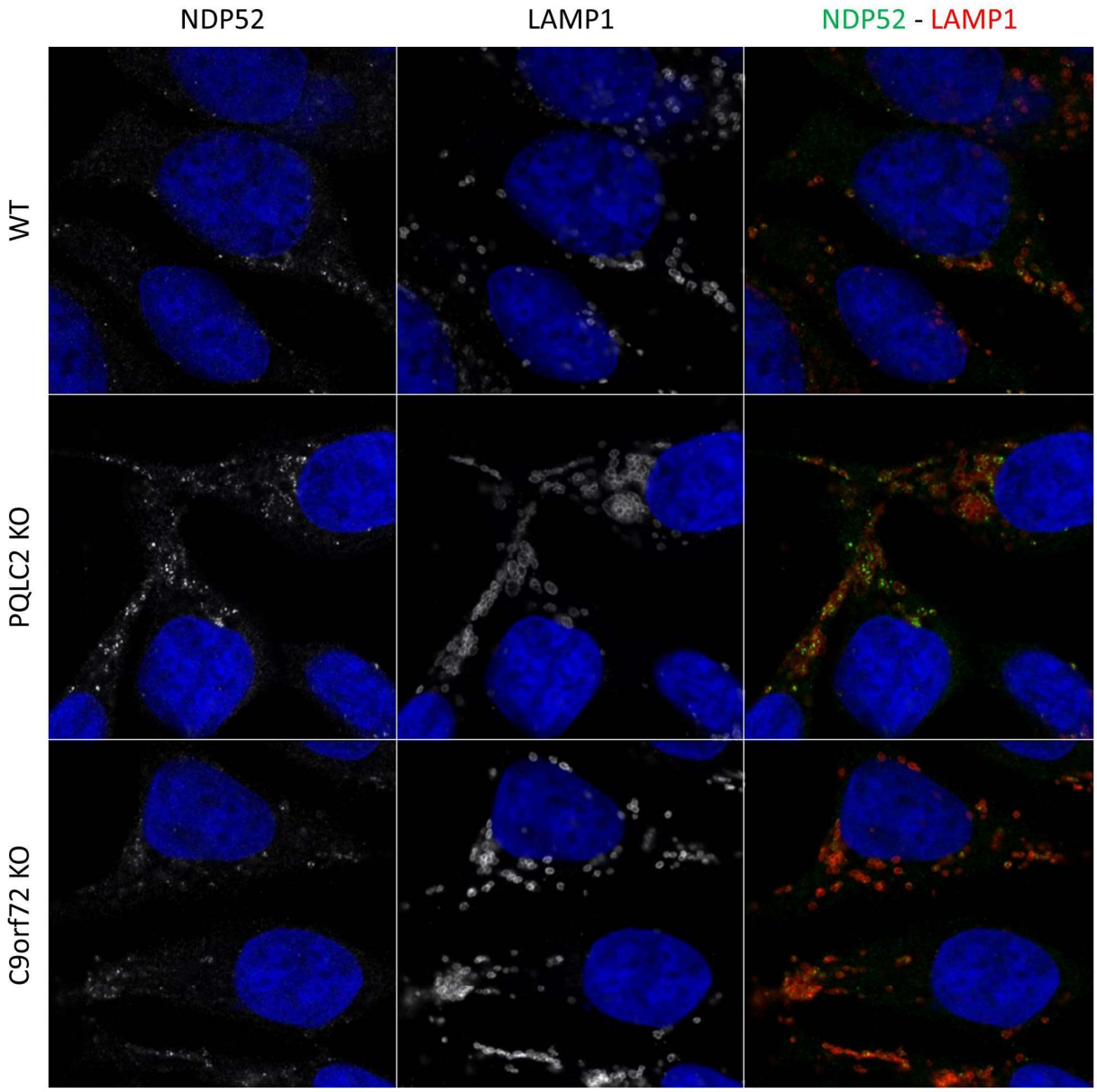


Figure 40 : L'accumulation de punctas NDP52 induite par la perte de PQLC2 dans les cellules HAP1 non carencées n'est pas phénocopiée par la perte de C9orf72. Détection par immunofluorescence et microscopie confocale de LAMP1 et NDP52 sur cellules HAP1 WT et KO pour PQLC2 pour C9orf72, en présence d'acides aminés (milieu complet).

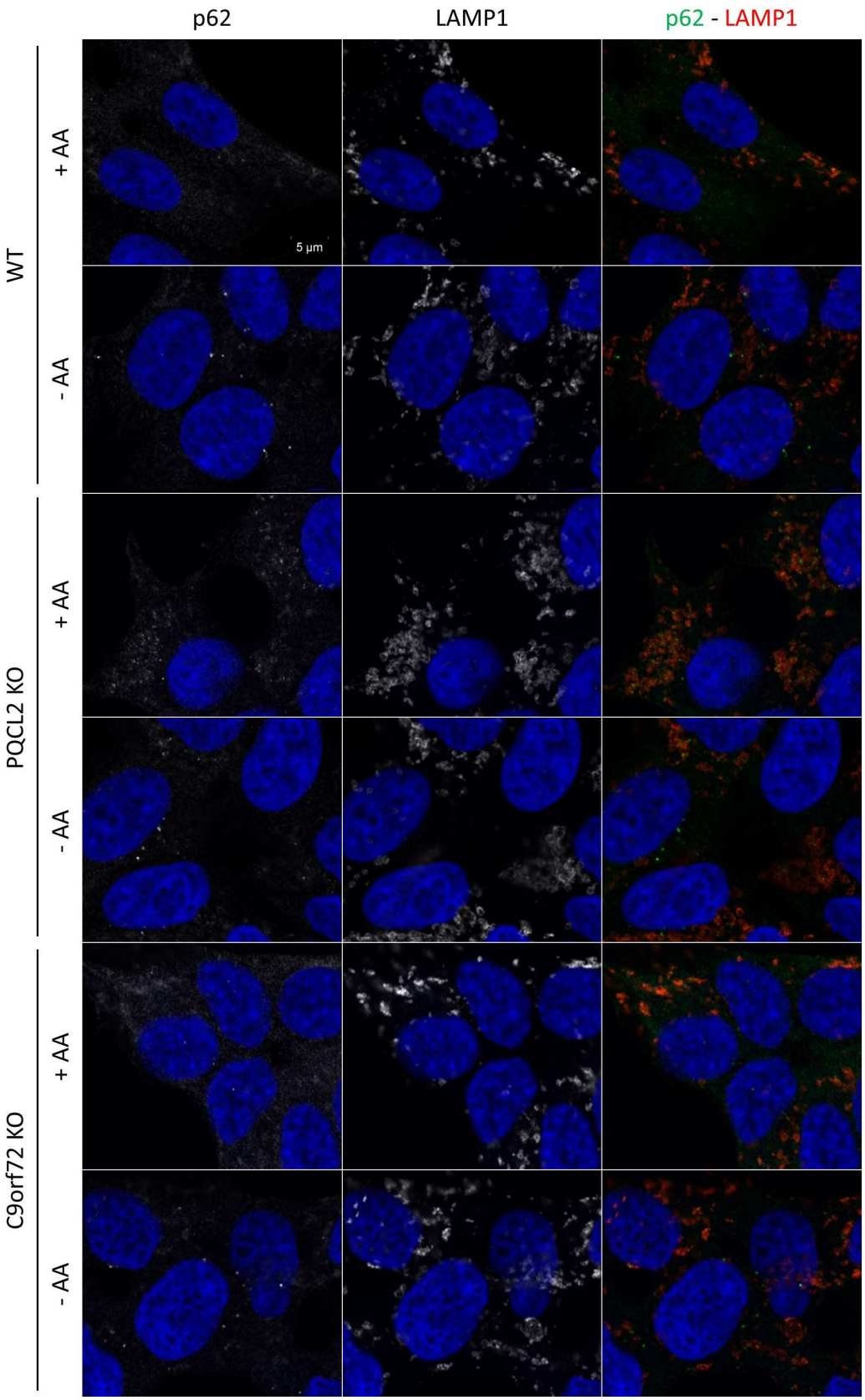


Figure 41 : L'accumulation de punctas p62 induite par la perte de PQLC2 dans les cellules HAP1 non carencées n'est pas phénocopiée par la perte de C9orf72. Détection par immunofluorescence et microscopie confocale de LAMP1 et p62 sur cellules HAP1 WT et KO pour PQLC2 pour C9orf72, en présence d'acides aminés (milieu complet) ou en leur absence (EBSS + sérum dialysé).

Ces expériences exploratoires tendent à indiquer que le phénotype d'accumulation de p62 et NDP52 dans les cellules PQLC2 KO ne dépend pas de la capacité à recruter le complexe C9orf72 aux lysosomes. Les phénomènes observés dans les cellules HAP1 PQLC2 seraient donc plutôt dus à la perte du transport lysosomal d'acides aminés cationiques.

3.4) Données préliminaires : lien avec mTOR et le cycle de régénération des lysosomes ?

Les punctas p62 associés aux lysosomes dans les cellules PQLC2 KO ne sont plus visibles après 2 heures de carence en acides aminés. Parmi les effets bien connus de la diminution des niveaux cytoplasmiques d'acides aminés, on compte la dissociation du complexe mTORC1 des lysosomes et la levée subséquente de l'inhibition de TFEB ; l'activation de la macroautophagie pourrait donc être à l'origine de la disparition des punctas p62. Nous avons cherché à voir si l'inhibition pharmacologique de mTOR par la Torin pendant 2 heures pouvait mimer les effets de la carence en acides aminés. Les résultats présentés en figure 42 montrent que ce n'est pas le cas, ce qui tend à indiquer que la diminution des niveaux d'acides aminés induit une ou plusieurs autre(s) réponse(s) indépendante(s) de mTORC1 et que PQLC2 est impliqué dans au moins l'une d'elles. Afin de vérifier que l'absence d'effet de la Torin n'était pas simplement due à un temps de traitement trop court, l'expérience a été répétée avec un traitement sur la nuit (environ 18 heures) : là aussi, l'inhibition prolongée de mTOR n'a pas permis de faire disparaitre les punctas p62 (données non montrées). Il serait intéressant de confirmer ce résultat avec un autre inhibiteur de mTOR.

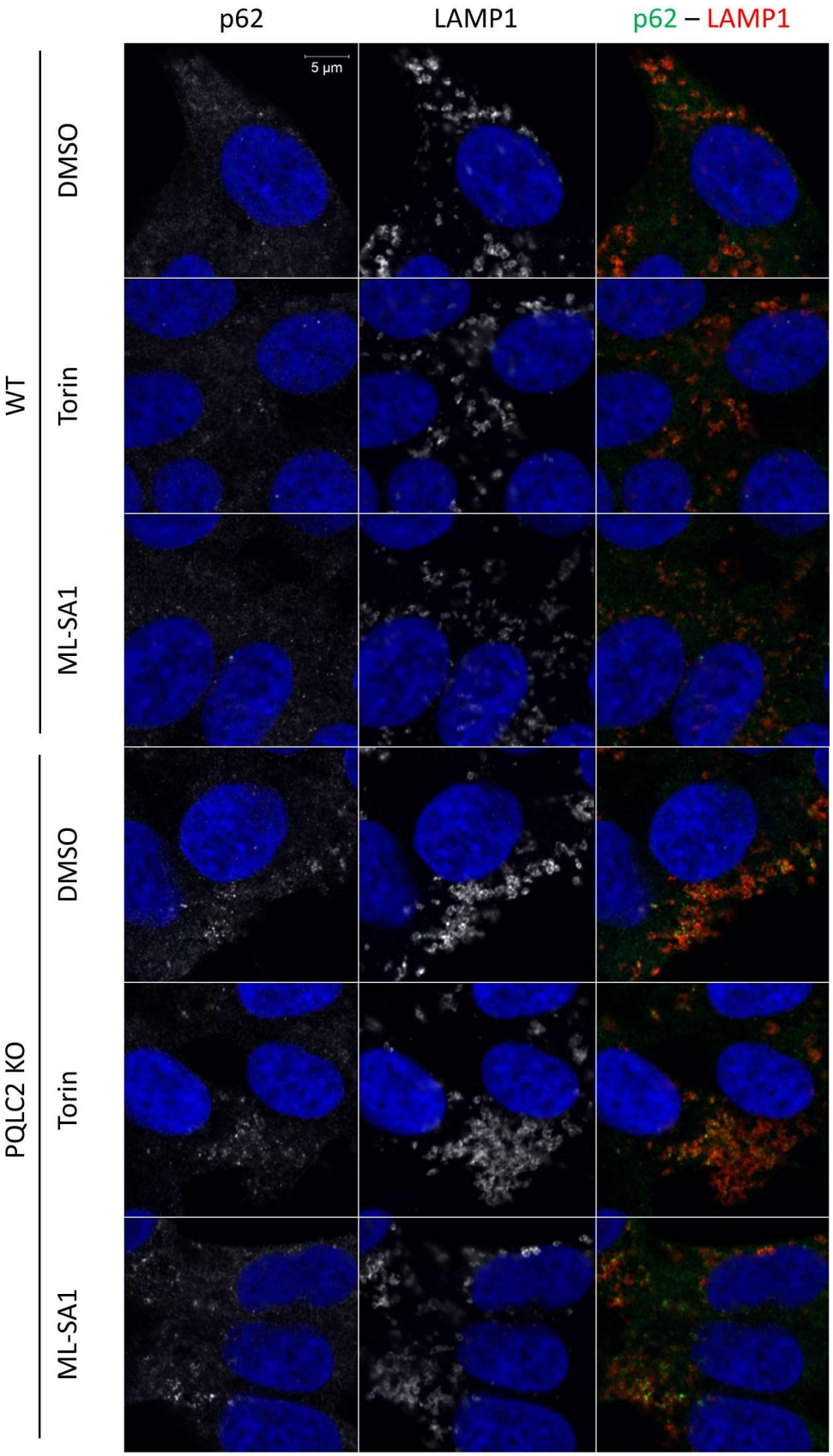


Figure 42 : La dégradation des punctas p62 associés aux compartiments LAMP1 ne dépend ni de mTORC1 ni de la libération de calcium. Détection par immunofluorescence et microscopie confocale de LAMP1 et p62 sur cellules HAP1 WT ou KO pour PQLC2, traitées avec 5 µM de Torin ou 10 µM de ML-SA1 ou le solvant seul (DMSO 0,1%) pendant 2 heures.

Nous avons par ailleurs initié diverses expériences visant à tenter de disséquer la mise en place de ce phénotype, qui ont apporté des résultats préliminaires nécessitant cependant d'être solidifiés. L'inhibition 'non spécifique' du flux autophagique avec de la chloroquine (qui agit en neutralisant le pH lysosomal et/ou en inhibant la fusion autophagosome-lysosome) permet d'une part aux cellules WT de phénocopier les cellules PQLC2 KO en termes d'accumulation de punctas p62 aux lysosomes, et d'autre part de prévenir la disparition de ces punctas lors d'une carence en acides aminés (données non montrées).

La microautophagie fait intervenir des lipases acides lysosomales, qui lysent la membrane des vésicules intraluminales contenant les protéines ou organites à dégrader. Nous avons testé un inhibiteur pharmacologique de lipases, l'orlistat, pour évaluer si ces lipases interviennent dans la disparition apparente des puntas p62. Cet agent pharmacologique n'empêche pas leur dégradation dans les cellules KO soumises à une carence en acides aminés (données non montrées). Il nous faudra répéter ces expériences et clarifier l'implication de l'activité lytique lysosomale dans ce mécanisme cellulaire de réponse à la carence impliquant PQLC2.

Enfin, nous avons commencé à explorer la possibilité que le phénotype des cellules KO soit une conséquence d'un défaut de fission des autophagolysosomes, plus exactement de reformation des lysosomes terminaux. Ce phénomène est dépendant de la libération de calcium par TRPML1 (Cao et al., 2017) induite par le PI(3,5)P2, nous avons donc traité nos cellules avec du ML-SA1, un activateur pharmacologique de TRPML1 (figure 42), mais n'avons pas observé d'effet correcteur. TRPML1 n'est cependant pas le seul effecteur du PI(3,5)P2, et certaines voies de reformation des lysosomes peuvent être indépendantes de la libération de calcium (Bissig, Hurbain, Raposo, & van Niel, 2017). Mon laboratoire commence à mettre en place des protocoles permettant de visualiser la dynamique des phénomènes de tubulation et

de fission (endo/auto)lysosomale après inhibition transitoire de PIKfyve ; ce nouvel axe devrait permettre de clarifier si PQLC2 joue un rôle dans ces mécanismes.

4) Conclusions de l'approche réductionniste sur cellules HAP1

L'observation des compartiments lysosomaux dans les différents clones de cellules HAP1 a révélé que l'absence de PQLC2 conduit à un regroupement des lysosomes en 'clusters', sans pour autant impacter leur capacité à fusionner avec les endosomes. Nous avons aussi observé qu'en conditions basales, c'est-à-dire en présence d'acides aminés, les récepteurs de l'autophagie sélective TAX1BP1 et NDP52, l'ubiquitine ligase NDFIP1 et les protéines adaptatrices p62 et LC3 sont régulés positivement au niveau de compartiments exprimant LAMP1 dans les cellules PQLC2 KO par rapport aux WT.

La perte de PQLC2 impacte donc le taux basal de ces protéines, mais en revanche n'impacte pas la réponse à une carence en acides aminés qui induit leur dégradation rapide par microautophagie. Par ailleurs, nos données préliminaires indiquent que la régulation positive de ces protéines serait un processus indépendant de l'activité de mTOR ou du recrutement du complexe C9orf72 aux lysosomes.

Nous n'avons pas pu identifier le mécanisme à la base du phénotype des cellules HAP1 PQLC2 KO, mais ces observations ouvrent de nouvelles pistes pour comprendre les défauts observés dans les CESVV d'embryons de souris *Pqlc2* KO. Ces aspects seront présentés plus en détail dans la discussion générale du mémoire.

b) L'activité de transport des deux protéines est-elle impliquée dans la létalité synthétique ?

L'inactivation de *Ctns* et/ou *Pqlc2* dans les sacs vitellins d'embryons murins induit un phénotype d'élargissement des vacuoles positives pour LAMP1. Par ailleurs, le KO de PQLC2 sur cellules HAP1 induit une accumulation de récepteurs d'autophagie sélective, de manière apparemment indépendante de l'activité de C9orf72. Cependant, ces observations ne nous permettent pas de d'identifier quelles sont les fonctions de ces transporteurs dont la perte est à l'origine de la mise en place de ces phénotypes.

La fonction première de la cystinosine et de PQLC2 est de transporter la cystine et les acides aminés cationiques, respectivement. Nous avons donc interrogé le rôle de l'activité de transport de *Ctns* d'une part, et de *Pqlc2* d'autre part, dans l'établissement du phénotype vacuolaire et de la létalité synthétique embryonnaire. Il est possible de compenser la perte de l'activité cystinosine à l'aide de la cystéamine, molécule utilisée pour le traitement de la cystinose (voir introduction), c'est donc la stratégie que nous avons adopté pour le KO de *Ctns*. En revanche, il n'est pas possible de compenser directement l'activité de transport de PQLC2, nous avons donc dû opter pour une approche indirecte de supplémentation nutritionnelle de souris gravides.

1) Supplémentation des modèles murins par les substrats de PQLC2

A l'occasion de ses travaux de thèse, Xavier Leray avait proposé que la létalité embryonnaire du DKO puisse être la conséquence directe d'un défaut d'efflux lysosomal des substrats de *Ctns* et *Pqlc2*, causant une carence chronique pour ces acides aminés dans les cellules de l'embryon. Pour tester cette hypothèse, il avait supplémenté avec de l'arginine à hauteur de 5,5 g/L l'eau de boisson de souris gravides dans différents types de croisements, ce qui revient à essayer de court-circuiter la nutrition histiotrophique et l'export par *Pqlc2* comme source d'arginine pour l'embryon. Au moment où il avait initié ces expériences, le décours temporel d'apparition des défauts était mal connu, cette stratégie se reposait donc sur l'apport d'arginine par le placenta.

Ses résultats montraient, d'une part, une absence de correction de la létalité du DKO, mais, d'autre part, une normalisation significative de la fréquence de naissance des génotypes trialléliques (*Ctns* -/- ; *Pqlc2* +/- et *Ctns* +/- ; *Pqlc2* -/-) normalement associés à une létalité embryonnaire partielle.

Au commencement de ma thèse, j'ai poursuivi ces expériences de supplémentation dans des conditions identiques afin d'augmenter la taille de la population dans certains types de croisements ; les résultats obtenus ont conforté ceux de Xavier (figure 43). En parallèle, nous avons aussi testé dans les mêmes types de croisement et avec le même mode de supplémentation (eau de boisson) une double supplémentation avec de l'arginine (5,5 g/L) et de la N-acétylcystéine (NAC) à 2,4 g/L. La NAC est une molécule servant de précurseur de cystéine et généralement utilisée comme agent antioxydant en raison de sa capacité à augmenter les niveaux cellulaires de glutathion (Ho, Chen, & Bray, 1999; Jun Li, Wang, Stoner,

& Bray, 2002). Etant donné que la cystéine s'oxyde dans l'eau de boisson, il est préférable d'utiliser la NAC, plus stable, pour élever les niveaux cellulaires de cystéine. L'idée de ce double apport d'arginine et de cystéine sous forme de NAC était de supplémenter les embryons DKO par un substrat de chaque transporteur muté. Cependant comme on peut le voir sur la figure 43 cette stratégie ne s'est pas avérée payante, et on voit même une tendance à aggraver la situation dans le cas des croisements ♂ *Ctns* -/- ; *Pqlc2* +/- avec ♀ *Ctns* +/- ; *Pqlc2* -/-.

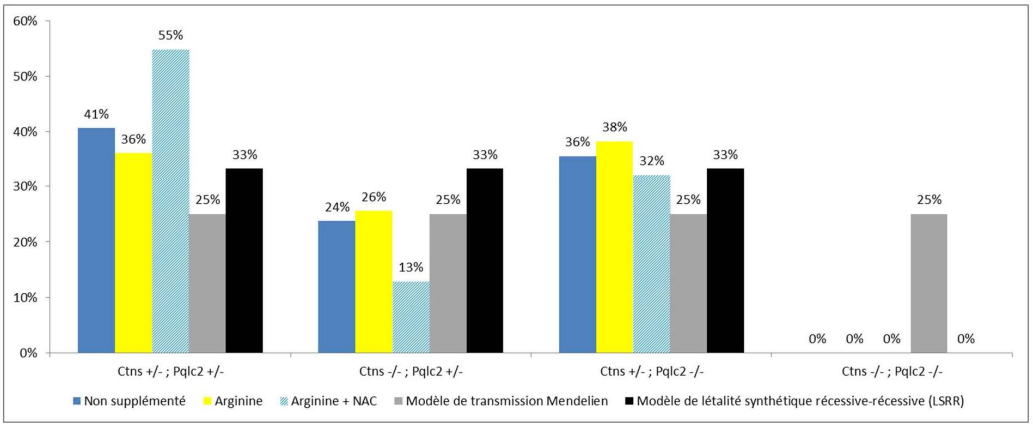
Par la suite, nous avons souhaité reproduire l'effet positif de l'arginine avec davantage de conditions de supplémentation nutritionnelles : de nouveau l'arginine, mais aussi l'histidine et la lysine (les autres substrats de *Pqlc2*) et la citrulline (utilisée comme précurseur d'arginine ayant une meilleure disponibilité, voir figure 44 B). Le croisement asymétrique avec le mâle *Ctns* +/- ; *Pqlc2* -/- et la femelle *Ctns* -/- ; *Pqlc2* +/- étant celui dans lequel la létalité partielle est la plus forte (figure 20), nous avons sélectionné ce type de croisement afin de maximiser nos chances de détecter une correction limitée de la létalité partielle (figure 44 A). La première étape a consisté à prévoir en amont la production d'un grand nombre de souris du bon génotype afin de lancer simultanément plusieurs croisements par condition avec des animaux d'âges relativement homogènes.

A

Supplémentation des croisements asymétriques ♂ Ctns -/- ; Pqlc2 +/- x ♀ Ctns +/- ; Pqlc2 -/-

Génotype	Non supplémenté		Arginine		Arginine + NAC		Modèle de transmission Mendelien	Modèle de létalité synthétique récessive-récessive (LSRR)
	Effectif	%	Effectif	%	Effectif	%		
Ctns +/- ; *Pqlc2* +/-	24	41%	17	36%	34	55%	25%	33%
Ctns -/- ; Pqlc2 +/-	14	24%	12	26%	8	13%	25%	33%
Ctns +/- ; Pqlc2 -/-	21	36%	18	38%	20	32%	25%	33%
Ctns -/- ; Pqlc2 -/-	0	0%	0	0%	0	0%	25%	0%
Total	59	100%	47	100%	62	100%	100%	100%

Chi² vs Mendel	3,60E-05	5,78E-04	3,12E-09
Chi² vs LSRR	0,262	0,517	2,76E-04



B

Supplémentation des croisements asymétriques ♂ Ctns +/- ; Pqlc2 -/- x ♀ Ctns -/- ; Pqlc2 +/-

Génotype	Non supplémenté		Arginine		Arginine + NAC		Modèle de transmission Mendelien	Modèle de létalité synthétique récessive-récessive (LSRR)
	Effectif	%	Effectif	%	Effectif	%		
Ctns +/- ; *Pqlc2* +/-	39	51%	20	38%	21	42%	25%	33%
Ctns -/- ; Pqlc2 +/-	10	13%	13	25%	7	14%	25%	33%
Ctns +/- ; Pqlc2 -/-	27	36%	20	38%	22	44%	25%	33%
Ctns -/- ; Pqlc2 -/-	0	0%	0	0%	0	0%	25%	0%
Total	76	100%	53	100%	50	100%	100%	100%

Chi² vs Mendel	2,49E-10	1,59E-04	3,78E-06
Chi² vs LSRR	2,29E-04	0,397	0,015

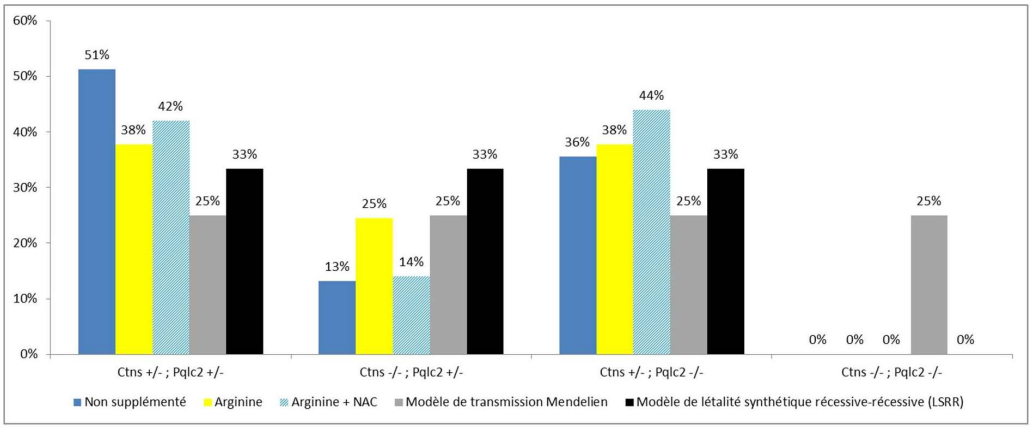


Figure 43 : Transmission génétique des allèles mutés de *Pqlc2* et *Ctns* dans les croisements d'animaux trialléliques avec ou sans supplémentation nutritionnelle dans l'eau de boisson. Distribution des génotypes des souris nées de croisements asymétriques ♂ *Ctns* -/- ; *Pqlc2* +/- x ♀ *Ctns* +/- ; *Pqlc2* -/- **(A)** ou ♂ *Ctns* +/- ; *Pqlc2* -/- x ♀ *Ctns* -/- ; *Pqlc2* +/- **(B)** supplémentés ou non avec de l'arginine (5,5 g/L dans l'eau de boisson) ou une combinaison d'arginine et de N-acétylcystéine (NAC) (5,5 et 2,4 g/L dans l'eau de boisson, respectivement).

Ensuite s'est posée la question du mode d'administration du supplément en acides aminés. L'ajout dans l'eau de boisson présente l'inconvénient de devoir changer les biberons deux à trois fois par semaine pour des raisons sanitaires et de dégradation des molécules, et donc de refaire des solutions fraiches à chaque fois. L'alternative que nous avons choisie était d'acheter des granulés supplémentés en acide aminé (et les granulés contrôle non supplémentés) ; Ces granules sont stables et nécessitent peu de maintenance. Nous avons aussi décidé d'augmenter les doses en raisonnant que si l'expérience de Xavier avait permis de corriger la létalité partielle des génotypes trialléliques mais pas la létalité du DKO, c'était peut-être à cause d'une dose insuffisante d'arginine. La supplémentation dans l'eau de boisson permet une prise additionnelle d'arginine estimée à 22 mg par jour par souris, alors que la supplémentation par les granulés permet, dans les conditions que nous avons choisies, une prise estimée à 135 mg par jour par souris. La composition exacte des granulés est disponible en annexe 8.

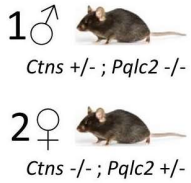
Les croisements supplémentés ont commencé au mois de juillet 2018, et les portées ont été génotypées entre les mois d'août 2018 et de janvier 2019 (une partie des croisements ayant dû être remplacés lorsque les femelles vieillissaient et devenaient moins productives). Les résultats sont présentés en figure 44 E et F. On en tire deux informations surprenantes :

1) La distribution des génotypes des souriceaux nés dans le groupe contrôle dévie significativement ($p < 0,001$) des prédictions Mendéliennes (comme attendu du fait de la létalité du DKO), mais en revanche elle ne montre pas de différence significative avec le modèle de létalité synthétique récessive-récessive. Autrement dit on ne voit pas de létalité partielle associée aux génotypes trialléliques ; nos efforts pour tenter de corriger cette dernière sont donc rendus caduques. C'est très surprenant car ce

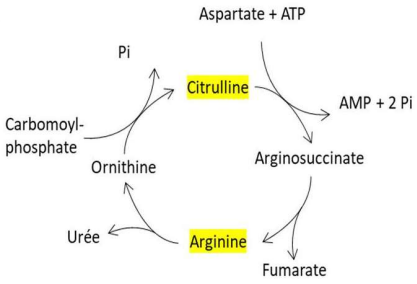
phénomène a toujours été observé en dehors du contexte de cette expérience. De plus, les souris utilisées dans tous les groupes sont elles-mêmes issues de croisements aussi variés que possible, on peut donc exclure l'idée qu'il s'agirait d'une sous-population particulière. Une possibilité est que la composition des granulés non supplémentés utilisés comme contrôle diffère suffisamment de celle des granulés avec lesquelles les souris sont nourries habituellement dans notre animalerie, et que cette différence de composition soit suffisante pour corriger la létalité synthétique partielle des génotypes trialléliques.

2) La supplémentation avec les granulés supplémentés en arginine semble avoir un effet délétère sur la létalité synthétique partielle des génotypes trialléliques, puisque contrairement au groupe contrôle, la distribution génétique des portées dévie significativement du modèle de létalité récessive-récessive ($p<0,02$). C'est aussi le cas avec la supplémentation en lysine ($p<0,01$) et en citrulline ($p<0,03$). Les conditions testées ont donc tendance à aggraver plutôt qu'à atténuer la létalité partielle, soit un résultat opposé à l'expérience précédente de supplémentation dans l'eau de boisson, dans la mesure où l'on peut les comparer. On peut imaginer que les doses plus importantes d'acides aminés utilisées ici ont pu avoir un effet toxique aigu sur les femelles gravides.

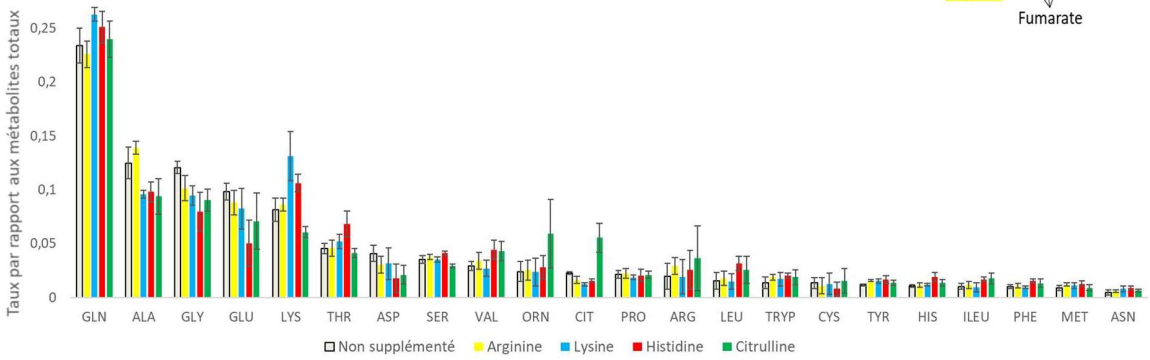
A



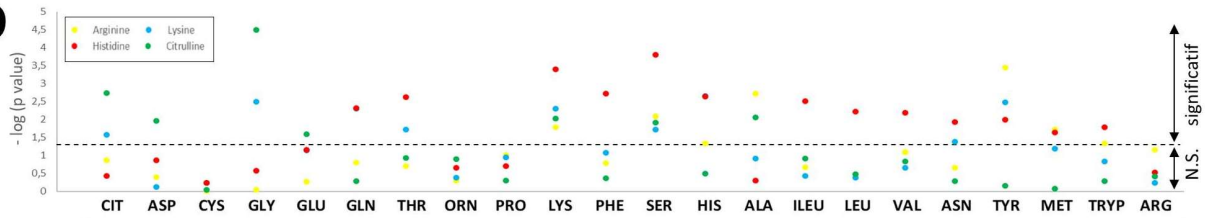
B



C

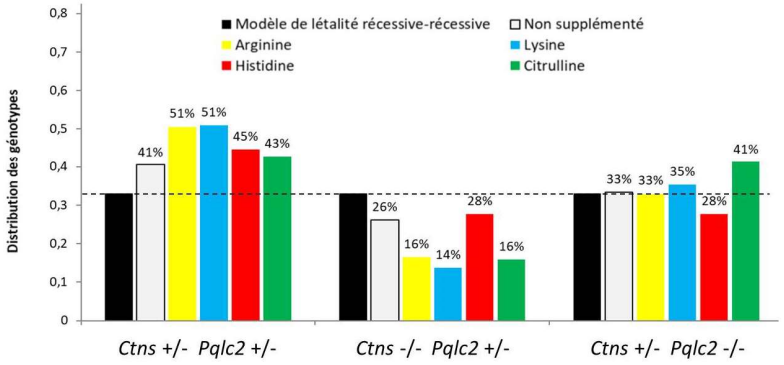


D



	Amplitude de variation des acides aminés par rapport au groupe contrôle																				
	CIT	ASP	CYS	GLY	GLU	GLN	THR	ORN	PRO	LYS	PHE	SER	HIS	ALA	ILEU	LEU	VAL	ASN	TYR	MET	TRYP	ARG
Arginine	0,840	0,863	0,985	0,991	1,058	1,126	1,179	1,200	1,221	1,240	1,251	1,253	1,268	1,313	1,314	1,329	1,346	1,413	1,539	1,570	1,579	1,768
Lysine	0,782	1,093	1,302	1,135	1,204	1,628	1,674	1,458	1,281	2,364	1,365	1,456	1,613	1,120	1,368	1,403	1,353	2,398	1,871	1,807	1,788	1,364
Histidine	0,921	0,577	0,799	0,875	0,677	1,408	1,975	1,516	1,268	1,725	1,973	1,530	2,331	1,041	2,158	2,673	1,980	2,354	1,855	1,861	1,893	1,728
Citruline	2,229	0,463	1,062	0,687	0,659	0,938	0,832	2,232	0,917	0,688	1,212	0,764	1,188	0,695	1,579	1,529	1,351	1,216	1,056	0,948	1,244	1,764

E



F

	Condition									
	Non supplémenté		Arginine		Lysine		Histidine		Citrulline	
Genotype	effectif	%	effectif	%	effectif	%	effectif	%	effectif	%
Ctns +/- Pqlc2 +/-	28	41%	46	51%	26	51%	21	45%	27	43%
Ctns -/- Pqlc2 +/-	18	26%	15	16%	7	14%	13	28%	10	16%
Ctns +/- Pqlc2 -/-	23	33%	30	33%	18	35%	13	28%	26	41%
Ctns -/- Pqlc2 -/-	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%
Total	69	100%	91	100%	51	100%	47	100%	63	100%

Chi² contre modèle de transmission Mendelien	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001
Chi² contre modèle de létalité récessive-récessive	p = 0,448	p = 0,012	p = 0,005	p = 0,228	p = 0,030

Figure 44 : L'apport externe d'acides aminés cationiques pendant la gestation échoue à compenser la perte concomitante de *Pqlc2* et *Ctns*. (A) Trois croisements asymétriques avec un mâle *Ctns* +/- ; *Pqlc2* -/- et deux femelles *Ctns* -/- ; *Pqlc2* +/- ont été mis en place par condition avec des granulés supplémentés ou non en arginine, histidine, lysine ou citrulline pendant toute la durée de l'expérience. **(B)** Représentation simplifiée du cycle de l'urée ; la citrulline est utilisée dans cette expérience comme précurseur d'arginine. **(C)** Niveaux relatifs d'acides aminés, normalisés par rapport à la quantité totale de métabolites dosés, dans le plasma de souris femelles utilisées dans l'expérience de supplémentation (N = 4 échantillons biologiques par condition, sauf arginine où N = 5). **(D)** Variations des taux plasmatiques d'acides aminés dans les conditions supplémentées par rapport au contrôle non supplémenté, avec la p value associée obtenue avec un test de Student (seuil de significativité fixé à α= 5%) ont été retenues. **(E & F)** Répartition des génotypes des nouveaux nés issus des croisements supplémentés et contrôle ; l'adéquation de ces distributions avec un modèle de transmission Mendélien ou avec un modèle de létalité synthétique récessive-récessive a été interrogée à l'aide d'un test de Chi^2 **(F)**.

Afin de contrôler que la supplémentation des granulés permet bien l'élévation des taux plasmatiques des acides aminés concernés, nous avons effectué des prélèvements sanguins sur les souris femelles et dosé les acides aminés avec l'aide d'un collaborateur (Christian Thiel, université de Heidelberg) (figure 44 C). Ces dosages ont été normalisés à la quantité d'acides aminés totaux pour chaque échantillon puis comparés au groupe contrôle (figure 44 D). Si les supplémentations en lysine et en histidine permettent bien d'élever les taux de ces molécules par rapport au groupe contrôle (2,4 et 2,3 fois, respectivement), les supplémentations en arginine et en citrulline échouent à faire évoluer significativement les taux d'arginine. De plus, on constate que ces supplémentations nutritionnelles impactent en réalité bien plus largement le métabolisme des acides aminés que ce que nous souhaitions : par exemple, la supplémentation en histidine augmente d'un facteur 2 ou plus les taux de thréonine, asparagine, isoleucine et leucine ; inversement, la supplémentation en citrulline diminue de plus de moitié les taux d'aspartate. Ainsi, les effets des conditions de supplémentation utilisées ne permettent pas d'induire l'augmentation spécifique d'un acide aminé donné, mais plutôt la variation d'un grand nombre d'entre eux et probablement l'altération du métabolisme.

Au moment où nous avions lancé cette expérience, nous imaginions que la fonction histiotrophique pourrait être perturbée chez les embryons DKO, mais nous ne savions pas encore que le sac vitellin constituait un lieu de convergence majeur des effets des KO de *Ctns* et *Pqlc2*, avec un phénotype drastique de vacuolisation des compartiments endolysosomaux accompagnée d'une altération probable de leur fonction dégradative. Bien que décevant en ce qui concerne la létalité synthétique partielle, cette expérience nous informe tout de même sur le fait que la létalité du DKO n'est pas corrigée. Cela va dans le sens d'un rôle vital du sac vitellin pendant les stades précoces du développement, et ce rôle ne peut pas être remplacé en supplémentant la souris gestante avec des acides aminés. En effet, il est peu probable que les acides aminés soient présents dans les sécrétions endométriales internalisées par les CESVV.

2) Rôles possibles de l'arginine dans le phénotype de létalité synthétique

2.1) Rôle possible de Pqlc2 et Ctns dans la protection contre le stress oxydant

L'exploration du rôle de l'activité de transport de *Ctns* et *Pqlc2* nous a poussés à tester si la disponibilité de leurs substrats pourrait jouer un rôle physiologique majeur pendant le développement embryonnaire. Si c'est le cas, la forte synergie entre les KO de *Ctns* et *Pqlc2* suggère que les substrats de ces deux transporteurs (en particulier l'arginine pour *PQLC2*) convergent vers une voie métabolique ou de signalisation vitale pour l'embryon. Une possibilité de convergence fonctionnelle entre ces substrats est la formation des défenses antioxydantes. C'est en effet un enjeu majeur pour l'embryon, qui doit s'adapter à la transition

progressive d'un milieu en quasi-anaérobie à un taux d'oxygène similaire à celui présent dans le sang de sa mère lorsque les tout premiers échanges placentaires commencent vers E10.

Il est bien établi que la perte de la cystinosine induit une perturbation de l'état redox du glutathion (GSH) et une susceptibilité accrue au stress oxydant (voir partie dédiée dans l'introduction). *Pqlc2* quant à lui exporte l'arginine, qui peut être utilisée dans la cellule pour produire du monoxyde d'azote (NO) via les NO-synthases (NOS).

Bien que le NO soit une espèce oxygénée réactive, il peut être utilisé comme défense antioxydante par la cellule grâce à la nitrosylation de certaines protéines, c'est-à-dire l'ajout d'un NO sur un thiol. Cette réaction est réversible, et elle protège le groupement thiol contre une oxydation plus poussée et irréversible (sulfinylation ou sulfonylation). Le NO est une molécule instable avec une demi-vie courte (quelques secondes), il nécessite donc d'être stabilisé pour perdurer dans le temps et agir au-delà de son site de production. Cette stabilisation fait intervenir principalement le thiol libre le plus abondant dans la cellule, c'est-à-dire le GSH. Le NO et le GSH réagissent ensemble pour former du nitrosoglutathion (GSNO), qui peut à son tour trans-nitrosyler d'autres protéines pour les protéger contre une oxydation poussée.

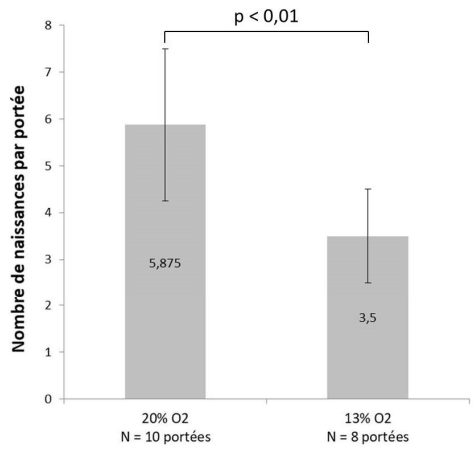
La synthèse du GSH est dépendante des niveaux cytosoliques de cystéine, et donc indirectement de la libération de cystine lysosomale par la cystinosine. L'inactivation concomitante de *Ctns* et *Pqlc2* pourrait induire une diminution des taux cytoplasmiques des substrats nécessaires à la formation de GSNO. Cela causerait un effondrement de cette ligne de défense et favoriserait la mise en place d'un stress oxydant. Cela est par ailleurs cohérent avec une étude montrant une perturbation du statut redox des thiols du protéome

embryonnaire chez qui la protéolyse dans les sacs vitellins (et donc la nutrition histiotrophique) est inhibée (Harris et al., 2015).

Pour tester cette hypothèse, nous avons envisagé de croiser nos modèles murins avec des souris déficientes en GSNO réductase (lignée GSNOR KO fournie par le Prof. Jonathan S. Stamler, Duke University). Malheureusement ces souris ont dû être placées en quarantaine à leur réception et le service en charge n'a pas réussi à établir une colonie. Nous avons donc examiné, comme approche alternative, si une hypoxie modérée, mais compatible avec le développement murin (Matheson, Veerbeek, Charnock-Jones, Burton, & Yung, 2016) pouvait corriger, ou du moins atténuer, l'une des létalités synthétiques induites par l'inactivation concomitante de *Ctns* et *Pqlc2*.

Pour cela, nous avons initié des croisements ♂ *Ctns* +/- ; *Pqlc2* -/- x ♀ *Ctns* -/- ; *Pqlc2* +/- en conditions d'hypoxie modérée (13% de dioxygène dans l'air au lieu de 20%). Etant donné que nous ne disposons pas d'un caisson hypoxique adapté à l'élevage de souris au laboratoire, une petite colonie de souris a été envoyée chez notre collaborateur, Graham Burton à l'université de Cambridge. Les croisements effectués là-bas en conditions d'hypoxie modérée étaient accompagnés de croisements en conditions de normoxie réalisés dans la même pièce : en effet, le caisson hypoxique est bruyant, et nous devions contrôler que cela n'ait pas d'impact sur les souris. Enfin, un point qu'il est important de préciser est que les animaux utilisés pour la condition hypoxie modérée n'ont été exposés à l'hypoxie que durant la période de gestation (pas avant) et n'ont été exposées qu'une fois à ce traitement : ces mesures étaient destinées à limiter le plus possible les phénomènes adaptatifs mis en place pour compenser le manque de dioxygène. Les résultats du génotypage de ces portées est présenté en figure 45 B.

A



B

Croisements asymétriques ♂ Ctns +/- ; Pqlc2 -/- x ♀ Ctns -/- ; Pqlc2 +/- avec ou sans hypoxie modérée

Génotype	Hypoxie (13% O_2) Cambridge		Normoxie (20% O_2) Cambridge		Normoxie (20% O_2) Saints-Pères		Modèle de transmission Mendelien	Modèle de létalité synthétique récessive-récessive (LSRR)
	Effectif	%	Effectif	%	Effectif	%		
***Ctns* +/- ; *Pqlc2* +/-**	16	53%	22	47%	39	51%	25%	33%
Ctns -/- ; Pqlc2 +/-	1	3%	5	11%	10	13%	25%	33%
Ctns +/- ; Pqlc2 -/-	13	43%	20	43%	27	36%	25%	33%
Ctns -/- ; Pqlc2 -/-	0	0%	0	0%	0	0%	25%	0%
Total	30	100%	47	100%	76	100%	100%	100%

Chi² vs Mendel	6,48E-06	1,16E-06	2,49E-10
Chi² vs LSRR	0,002	0,004	2,29E-04

Chi² : Normoxie (Cambridge) vs Normoxie (Saints Pères)	0,712
Chi² : Hypoxie (Cambridge) vs Normoxie (Cambridge)	0,410
Chi² : Hypoxie (Cambridge) vs Normoxie (Saints Pères)	0,254

Figure 45 : Transmission génétique des allèles mutés de *Pqlc2* et *Ctns* dans les croisements d'animaux trialléliques soumis ou non à une hypoxie modérée. (A) Influence de l'hypoxie sur la taille des portées (valeur de probabilité p obtenue avec un test de Student). **(B)** Distribution des génotypes des souris nées de croisements asymétriques ♂ *Ctns* +/- ; *Pqlc2* -/- x ♀ *Ctns* -/- ; *Pqlc2* +/- placées en conditions d'hypoxie modérée (13% O_2) ou en normoxie (20% O_2) à l'animalerie de notre collaborateur à Cambridge ; la distribution obtenue dans notre propre animalerie est présentée à titre de comparaison. *Barres d'erreur = déviation standard*

Comme on peut le voir, l'hypoxie modérée ne corrige pas le létalité des souriceaux DKO, ni la létalité partielle des génotypes trialléliques. Au contraire, elle semble plutôt avoir un effet délétère sur la naissance d'individus trialléliques *Ctns* -/- ; *Pqlc2* +/-, c'est-à-dire le génotype qui était déjà le plus affecté par le phénomène de létalité synthétique partielle. Cette tendance n'est néanmoins pas validée par l'analyse statistique en raison de l'effectif total plus faible. La taille réduite des portées sous hypoxie (figure 45 A) ne semble pas liée à une réponse propre à notre lignée, car une réduction similaire se produit chez les WT (Matheson et al., 2016).

Le but de cette expérience était de tester si l'exposition de la femelle gestante à hypoxie modérée pouvait diminuer les niveaux d'oxygène auxquels sont exposés les embryons lors des premiers échanges gazeux par le placenta (autour d'E10), et ainsi compenser la baisse putative des défenses antioxydantes induite par le DKO. Cependant, cette expérience avait été lancée au début de ma thèse, c'est-à-dire avant que nous ayons connaissance que la dysmorphie embryonnaire induite par DKO était déjà bien établie à E10,5.

2.2) Possibilité d'une modulation indirecte de mTORC1 par le contrôle des niveaux intralysosomaux d'arginine par PQLC2

La littérature documente bien les rôles physiologiques de la cystinosine dans la formation du glutathion (Sumayao, McEvoy, Newsholme, & McMorrow, 2016), dans la machinerie de senseur des acides aminés pour mTORC1 (Andrzejewska et al., 2016) et dans l'autophagie médiée par chaperons (Zhang et al., 2017). On commence aussi à avoir une idée plus précise des mécanismes cellulaires mis en jeu dans l'établissement du syndrome de Fanconi chez les patients cystinotiques (Festa et al., 2018).

En revanche, en dehors de sa fonction de transport et de son rôle dans le traitement de la cystinose par la cystéamine (Jézégou et al., 2012; Liu et al., 2012), on connait mal les autres rôles de PQLC2 dans la cellule. L'étude récente du groupe de Shawn Ferguson (Joseph Amick et al., 2020) indique que la perte de PQLC2 induit une diminution de la réactivation de mTORC1 par les acides aminés cationiques. Ils affirment que cet effet est indirect et dû à la perte de localisation lysosomale du complexe C9orf72 en s'appuyant sur le fait que la surexpression

d'un mutant de C9orf72 localisé aux lysosomes de manière constitutive restaure la réactivation de mTORC1 par les acides aminés cationiques dans des cellules PQLC2 KO. Cependant, ils ne démontrent pas l'absence d'effet de la surexpression de ce mutant de C9orf72 dans ces cellules WT, ce qui rend impossible la distinction entre un effet qui serait effectivement dû à la restauration de la localisation lysosomale, et un artefact dû à la surexpression de la protéine.

Le rôle de C9orf72 dans ce mécanisme mérite donc des investigations supplémentaires, mais l'existence d'un rôle de PQLC2 dans l'activation de mTORC1 est un phénomène très encourageant qui fait écho à une hypothèse proposée par Bruno Gasnier et Xavier Leray dans la thèse de ce dernier. Ses travaux ont permis de mettre en évidence plusieurs propriétés mécanistiques importantes de ce transporteur, avec des implications importantes sur son rôle dans la cellule. En effet, PQLC2 n'est pas couplé aux protons et il est régulé par l'arginine. Il doit donc fonctionner de manière bidirectionnelle dans les lysosomes et son rôle pourrait être de réguler le taux intralysosomal d'arginine, un paramètre important du contrôle de mTORC1 (Rebsamen et al., 2015; S. Wang et al., 2015). La stabilité de la concentration lysosomale d'arginine est par ailleurs cohérente avec l'étude du métabolisme lysosomal du groupe de David Sabatini (Abu-Remaileh et al., 2017) qui montre qu'en cas de carence nutritionnelle les niveaux d'arginine luminale varient peu.

Comme le montrent les expériences d'influx d'arginine tritiée sur lysosomes partiellement purifiés présentées dans la première partie (figure 18 B et C), PQLC2 est responsable d'une part importante de l'influx d'arginine dans les lysosomes. On sait grâce aux travaux de Xavier Leray que PQLC2 est particulièrement sensible au potentiel de membrane lysosomal. Or, on sait que les canaux ioniques des lysosomes tels que les TPC1/2 jouent un rôle essentiel dans

l'établissement de ce potentiel, et qu'ils intègrent eux-mêmes différents signaux tels que le PI(3,5)P2 ou mTORC1 (Cang et al., 2013; X. Wang et al., 2012). Ainsi, le transport d'arginine par PQLC2 pourrait indirectement répondre à ces stimuli. Nous avons donc cherché à moduler l'activité de PQLC2 en influençant le potentiel de membrane lysosomal.

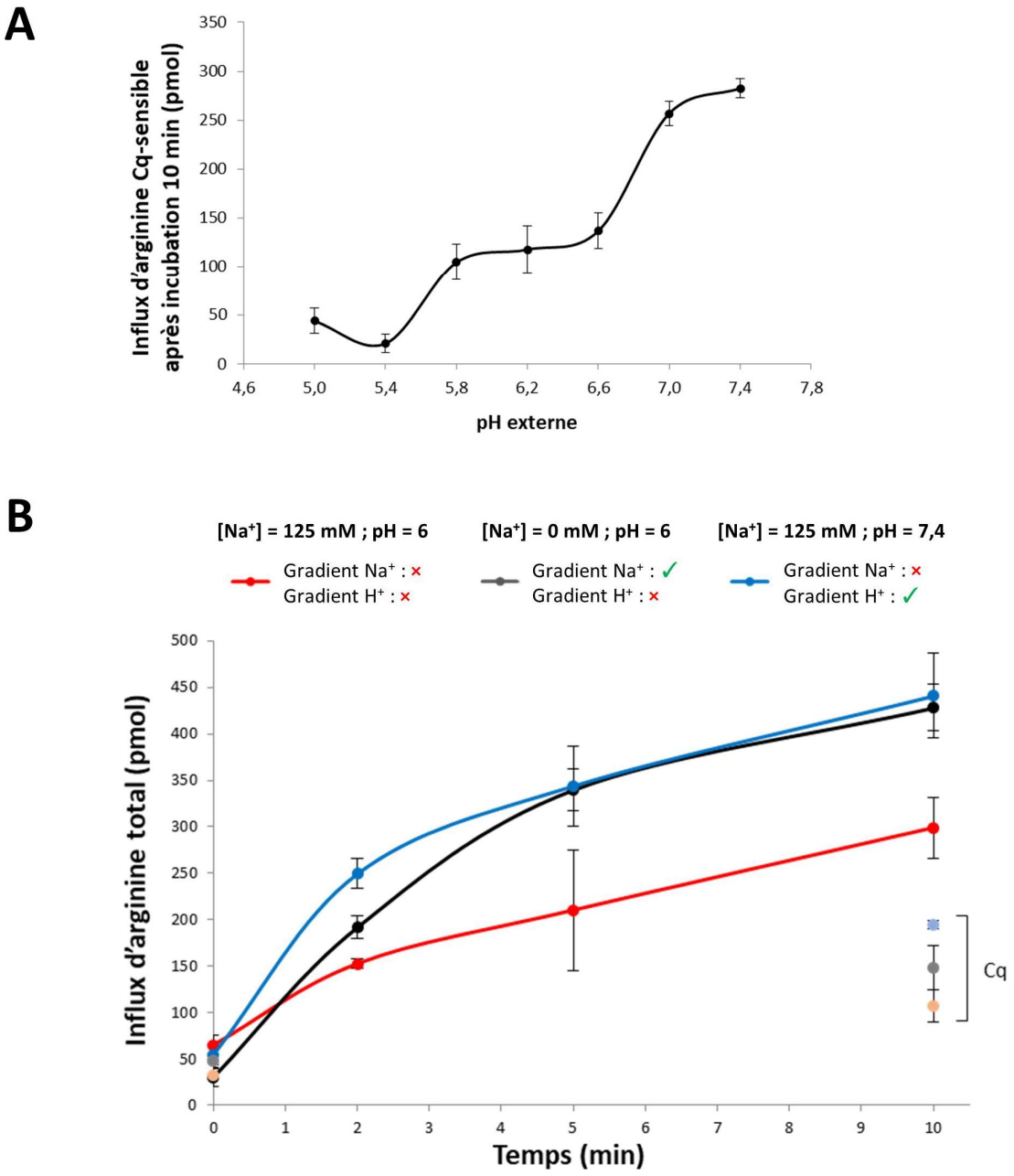


Figure 46 : Dépendance de l'activité de transport de PQLC2 vis-à-vis du potentiel de membrane lysosomal. (A) Quantité d'arginine accumulée dans des lysosomes partiellement purifiés incubés 10 minutes dans un tampon contenant de l'arginine tritiée en fonction du pH du tempon. **(B)** Comparaison de l'influx d'arginine dans les lysosomes en fonction du potentiel électrique de membrane induit par la composition ionique (Na^+ et H^+) du tampon.
Barres d'erreur = déviation standard. Cq = chloroquine

Les expériences de transport anciennes montraient une dépendance de l'activité du « système c » (nom employé avant l'identification de PQLC2) vis-à-vis du pH auquel le côté cytosolique des lysosomes est exposé (autrement dit, le pH du tampon de transport) (Ronald L Pisoni et al., 1985). Nous avons obtenu un résultat similaire : la figure 46 A montre que l'influx d'arginine est fortement activé à pH cytosolique neutre ou légèrement alcalin.

PQLC2 ne co-transportant pas de protons, son activité ne dépend pas directement du gradient de cet ion. Il est possible soit que la protonation anormale d'un résidu de PQLC2 exposé au cytosol inactive la protéine (une situation dans laquelle le cytosol aurait un pH de 5 étant impossible physiologiquement), soit que le potentiel de membrane est modifié par l'altération du gradient de protons.

On retrouve une concentration de protons plus forte dans la lumière lysosomale (pH 4,5 – 5) que dans le cytosol (pH 7 – 7,4), ce qui va favoriser une polarisation négative des lysosomes. Mais les protons ne sont pas les seuls ions dont le gradient contribue à établir le potentiel électrique de la membrane du lysosome. Ce dernier est défini par le potentiel d'équilibre des différents ions présents de part et d'autre de la membrane, et de leurs perméabilités relatives à travers cette membrane. Ainsi, on peut envisager de compenser la perte du gradient de protons (qui se produit lorsque que l'on baisse le pH à l'extérieur des lysosomes) en modifiant artificiellement le gradient d'un autre ion. Notre choix s'est porté sur le sodium ; le détail technique de cette approche est présenté en annexe 11.

Ainsi, on peut voir sur la figure 46 B que l'augmentation d'influx d'arginine est similaire lorsque l'on polarise négativement les lysosomes avec le gradient de sodium ou le gradient de protons, ce qui va dans le sens d'un lien direct entre la polarisation négative du lysosome et l'influx d'arginine, dont on sait maintenant qu'il est principalement porté par PQLC2.

Enfin, nous avons voulu tester si l'influx d'arginine est influencé par l'activité des canaux ioniques de la membrane lysosomale. Pour cela, nous avons utilisé le PI(3,5)P2 qui est un activateur endogène des canaux sodiques TPC1/2 et du canal calcique TRPML1, en combinaison avec du ML-SA1 qui est un activateur pharmacologique de TRPML1 qui agit en potentialisant l'effet du PI(3,5)P2. Les résultats présentés en annexe 12 ne montrent pas d'effet de l'activation de ces canaux sur l'influx d'arginine dans nos conditions expérimentales. Nous avons aussi comparé l'activation et l'inhibition pharmacologique de TRPML1 par le MK6-83 et le ML-SI3, respectivement (données non montrées). Là non plus nous ne voyons pas d'effet sur l'influx d'arginine ; ce dernier résultat pourrait simplement refléter que le calcium ne joue qu'un rôle très mineur dans l'établissement du potentiel de membrane du lysosome. L'absence d'effet d'activation des TPCs est cependant plus surprenante. Nos conditions expérimentales ne sont peut-être tout simplement pas adaptées : il manquerait aux canaux un partenaire protéique ou une espèce chimique essentielle normalement présente dans le cytosol mais absente dans notre tampon. Par ailleurs nos expériences n'ont pas testé l'importance du gradient de potassium ; des essais préliminaires sur des lysosomes traités ou non avec de la valinomycine, un ionophore potassique, ont donné des résultats présentant une grande variabilité, mais mériteraient d'être répétés.

Un autre groupe a montré un rôle de PQLC2 dans l'activation de mTORC1 par les acides aminés cationiques (Joseph Amick et al., 2020) et des données de mon laboratoire d'accueil suggèreraient un mécanisme de contrôle de l'arginine intralysosomale, et donc indirectement de mTORC1 (Rebsamen et al., 2015; S. Wang et al., 2015), par l'activité de transport de PQLC2. Ces résultats confirment que PQLC2 peut importer l'arginine dans les lysosomes (figures 18 et 46), en plus de l'exporter (Jézégou et al., 2012; Verdon et al., 2017). De plus, cet influx est favorisé en conditions physiologiques par le pH neutre du cytosol, et plus précisément par la

contribution des protons au potentiel membranaire lysosomal, identifiant ainsi un paramètre de contrôle l'activité de PQLC2. Cependant, nous ne sommes pas parvenus, dans nos conditions expérimentales, à déterminer quel(s) canal ionique lysosomal est crucial pour établir le potentiel de membrane du lysosome.

3) Correction des défauts du sac vitellin Ctns KO par la cystéamine

Il est possible de tester l'implication de l'activité de transport de la cystinosine dans l'établissement du phénotype vacuolaire du sac vitellin, en réalisant artificiellement la clairance de la cystine intralysosomale avec la cystéamine (la molécule utilisée pour le traitement de la cystinose).

En effet, une hypothèse simple pour expliquer l'élargissement des compartiments LAMP1-positifs dans les CESVV des embryons *Ctns* KO serait que la cystine s'y accumule massivement, à défaut de pouvoir être exportée par la cystinosine. La présence de lysosomes élargis est une caractéristique de la cystinose (la cystine pouvant aussi s'y accumuler sous forme de cristaux), que l'on retrouve également fréquemment dans d'autres maladies lysosomales. L'ampleur de l'augmentation de taille des lysosomes est plus marquée dans les CESVV *Ctns* KO que dans les cellules des patients cystinotiques, mais il faut garder à l'esprit que le sac vitellin est un tissu utilisant la protéolyse lysosomale de manière particulièrement soutenue, il est donc tributaire de la bonne fonction de cet organite.

Afin de tester cette hypothèse, nous avons incubé des sacs vitellins *Ctns* KO dans un milieu contenant de la cystéamine, pour laquelle nous avons testé différentes concentrations et différents temps d'incubation. Comme détaillé dans l'introduction, cette molécule réagit avec

la cystine accumulée dans les lysosomes et forme un mixte disulfure dont la clairance est assurée par PQLC2. Des données plus anciennes communiquées par le Dr. Christine Anne-Longin indiquaient qu'un traitement avec 100 µM de cystéamine pendant 20 minutes était suffisant pour éliminer complètement la cystine accumulée dans des fibroblastes de patients cystinotiques en culture. Nous avons testé ces conditions sur les sacs vitellins *Ctns* KO mais n'avons vu aucun effet. Après avoir testé plusieurs conditions de traitement, nous avons constaté que 4 heures de traitement avec 1 mM de cystéamine permettaient une correction du phénotype vacuolaire (voir figure 47). Des expériences complémentaires plus récentes montrent que 2 heures d'incubation avec cette concentration sont en réalité suffisantes pour obtenir le même effet (données non montrées).

En effet après 4 heures de traitement avec 1 mM de cystéamine, on observe une diminution drastique du nombre de vacuoles élargies et une disparition du gonflement cellulaire. On note cependant que des vacuoles de taille importante subsistent au niveau basolatéral, cette correction n'est donc pas totale. La présence de ces vacuoles résistantes à la cystéamine pourrait être que la perte de la cystinosine entraine une diminution des capacités protéolytiques des lysosomes, comme c'est le cas dans le syndrome de Fanconi chez les patients cystinotiques (cf. introduction). Dans ce cas, les protéines endocytées seraient bien acheminées aux lysosomes/vacuoles apicales, mais s'y accumuleraient faute de pouvoir être hydrolysées. Si ces vacuoles accumulent des protéines non dégradées ou incomplètement dégradées, il faudrait probablement traiter les sacs vitellins sur une durée plus longue pour pouvoir corriger cet aspect du phénotype. Cette hypothèse serait cohérente avec un défaut de dégradation de l'albumine, comme présenté dans la partie précédente.

Une précision importante à apporter est que le traitement à la cystéamine a aussi été testé *in vivo* sur des souris cystinotiques gravides (200 mg/kg/jour, avec de l'eau de boisson supplémentée à 1 mg/mL entre E0,5 et E10,5) mais que ce traitement s'est révélé totalement inefficace pour corriger le phénotype vacuolaire (données non montrées). Il est probable que la cystéamine ne soit tout simplement pas présente dans les sécrétions de l'endométrium utérin, la molécule ne pouvant alors pas atteindre le sac vitellin.

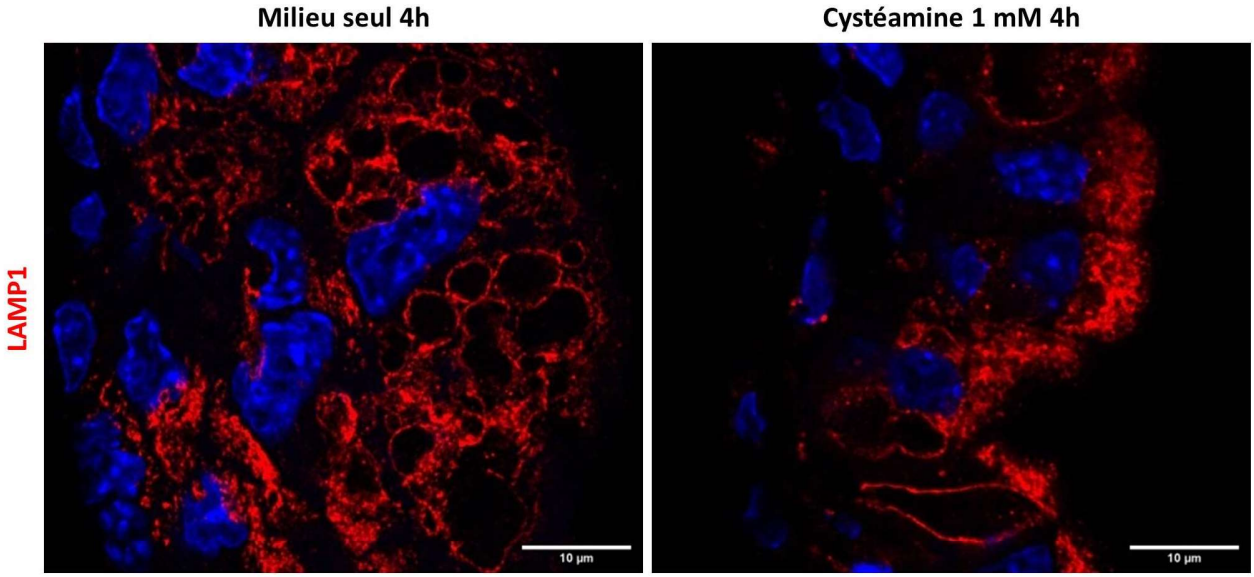


Figure 47 : Effet de la cystéamine sur un sac vitellin d'embryon de souris *Ctns* KO au stade E10,5. Des sacs vitellins vivants ont été coupés en deux puis incubés dans du milieu DMEM complet contenant (droite) ou non (gauche) 1 mM de cystéamine pendant 4 heures à 37°C, 5% CO_2 puis fixés et utilisés pour réaliser des cryosections sur lesquelles LAMP1 a été immunomarqué. La comparaison traité / non traité est toujours faite entre les deux moitiés d'un même sac vitellin. Les étoiles indiquent des vacuoles larges apparemment insensibles au traitement à la cystéamine.

En essayant différentes durées de traitement à la cystéamine, nous avons testé un traitement sur une nuit (environ 16 heures). Etonnamment, la condition contrôle de cet essai (incubation une nuit dans du milieu en l'absence de cystéamine) montrait une réversion spontanée du phénotype vacuolaire des sacs vitellins *Ctns* KO, ainsi que la présence de corps apoptotiques visualisables au DAPI (données non montrées). C'est une information importante, puisqu'elle nous indique que nos conditions de culture ne permettent pas de maintenir un sac vitellin *ex*

vivo sur une durée prolongée. D'autre part, l'expression du phénotype vacuolaire nécessite la présence de facteurs extérieurs, probablement présents dans les sécrétions endométriales, ou embryonnaires, mais absents dans le milieu de culture. Notamment, le milieu de culture contient des acides aminés mais vraisemblablement moins de protéines, ce qui diminuerait l'endocytose de matériel à dégrader dans les vacuoles. Nous avons par la suite cultivé dans les mêmes conditions (milieu riche, une nuit) des sacs vitellins DKO, dans lesquels le phénotype vacuolaire est plus sévère, et avons observé une réversion similaire du phénotype, renforçant l'idée que l'expression du phénotype est étroitement liée à l'environnement naturel des CESVV.

4) Développements méthodologiques pour un sauvetage génétique des cellules endodermales du sac vitellin viscéral

4.1) Création d'une lignée de souris transgénique exprimant la cystinosine uniquement dans le sac vitellin pendant le développement

Mon laboratoire a initié il y a quelques mois la production d'une lignée transgénique de souris avec une insertion (knock-in, KI) de *Ctns* couplé à la GFP sous le contrôle du promoteur de la transthyrétine (codée par le gène *Ttr*). *Ttr* s'exprime à l'âge adulte dans le cerveau, les yeux, le foie, le pancréas et les reins ; en revanche pendant le développement embryonnaire, il est exprimé dans l'endoderme viscéral et dans les CESVV qui en résultent, ainsi que dans d'autres dérivés de l'endoderme (foie, pancréas, estomac et intestin) (Kwon & Hadjantonakis, 2009). Le transgène est inséré au niveau du locus ROSA26, un site d'insertion couramment utilisé pour la mutagénèse chez la souris, qui permet une expression ubiquitaire du transgène.

Ces souris KI conditionnel seront croisées avec celles de notre lignée *Pqlc2*/*Ctns*. Si le gain de fonction de *Ctns* dans l'endoderme viscéral permet de corriger le phénotype embryonnaire du DKO et donc de permettre la naissance de souris de ce génotype, cela confortera l'hypothèse que le sac vitellin est un site important de l'interaction génétique létale entre *Pqlc2* et *Ctns.* Si cela échoue, cela voudra dire que l'interaction n'est pas spécifique d'un type cellulaire et qu'il nous faudra chercher un ou plusieurs autre(s) type(s) cellulaire(s) où l'on observerait une synergie des effets de la perte de fonction des deux gènes.

4.2) Adaptation d'un protocole d'électroporation in utero pour la transfection des CESVV

L'approche précédente implique de créer la souris KI dans un premier temps, puis de la croiser avec nos lignées mutantes dans un second temps : elle présente donc l'inconvénient d'être très lente. Nous nous sommes donc penchés sur la possibilité de réexprimer les gènes inactivés de manière transitoire dans les CESVV. Comme mentionné dans la partie précédente, le phénotype de vacuolisation des sacs vitellins KO cultivés *ex vivo* disparait au bout de quelques heures (entre 4 et 12 heures vraisemblablement), ce qui exclut totalement la possibilité de transfecter ces tissus *in vitro* tant que nous n'avons pas identifié des conditions de culture préservant le phénotype vacuolaire. Il nous fallait donc trouver un moyen de réaliser une transfection *in vivo*. Pour cela, nous avons adapté un protocole d'électroporation *in utero* (EIU) maîtrisé par le Dr. Damien Carrel, chercheur dans notre équipe. Cette procédure modifiée consiste à effectuer une chirurgie sur une souris gravide (7 ou 8 dpc), à injecter le(s) plasmide(s) à transfecter dans la cavité utérine à proximité immédiate des concepti afin qu'il(s) soi(en)t en contact avec le sac vitellin viscéral, puis à électroporer ces concepti. Les

souris ainsi opérées sont ensuite sacrifiées à 10 dpc pour extraire et fixer les sacs vitellins. Des essais préliminaires nous ont permis de valider que cette technique permet effectivement de transfecter l'endoderme extra-embryonnaire du sac vitellin : nous parvenons à faire exprimer une protéine exogène (GFP ou RFP) à un petit pourcentage des CESVV (non montré). Dans cette expérience, la GFP et la RFP sont sous le contrôle d'un promoteur ubiquitaire synthétique fort (CAG). Bien qu'il soit ubiquitaire, on obtient un marquage localisé dans le sac vitellin car c'est la première barrière entre le concepti et la lumière de l'utérus (voir figures 13 et 14).

Nous cherchons actuellement à obtenir la preuve de principe permettant de valider cette approche, à savoir réussir à corriger le phénotype vacuolaire de sacs vitellins cystinotiques en ré-exprimant la cystinosine sauvage dans les CESVV. Nous avons effectué un premier essai d'EIU avec CTNS-EGFP dans des concepti *Ctns* -/- à 8 dpc : la protéine a bien été exprimée dans des cellules mais sa localisation est anormale et le phénotype vacuolaire n'est pas corrigé (données non montrées). Nous n'avons qu'une seule observation de ce résultat négatif, et il nous faudra répéter cette expérience en électroporant à un stade plus précoce (7 dpc).

La validation de cette approche présentera l'avantage considérable de nous permettre de tester des mutants de *Ctns* dépourvus de l'activité de transport, afin de discriminer un rôle de la cystinosine qui serait purement signalétique (Andrzejewska et al., 2016) et un rôle de transport membranaire de cystine. De même, nous pourrons tester la réexpression dans des sacs vitellins *Pqlc2* KO de PQLC2 ou de protéines mutantes sans activité de transport.

D) Identification de défauts métaboliques associés à la létalité synthétique

a) Le liquide exocœlomique, une interface entre le sac vitellin et l'embryon

1) Le liquide exocœlomique

L'analyse morphologique des sacs vitellins a révélé un phénotype vacuolaire drastique dans les CESVV induit par la perte de *Ctns* et/ou *Pqlc2*. Nous avons souhaité contrôler si ce phénotype impacte ou non la fonction de nutrition histiotrophique du sac vitellin, c'est-à-dire sa capacité à fournir des nutriments à l'embryon. Le choix de l'observable employée pour mesurer l'efficacité de cette fonction biologique s'est porté sur la composition du fluide exocœlomique d'embryons au stade E10,5.

Le fluide exocœlomique est le liquide dans lequel baigne l'embryon, et se situe à E10,5 entre le sac vitellin viscéral et l'amnios (voir annexe 13). Sa composition reflète la production de nutriments issus de la dégradation lysosomale dans les CESVV, mais aussi les produits du métabolisme embryonnaire. La circulation sanguine primitive du sac vitellin est une voie d'acheminement possible de ces nutriments. Cependant, cette circulation se met en place plus tardivement que la nutrition histiotrophique. De plus, les CESVV et les vaisseaux sanguins du sac vitellin ne sont pas directement en contact, il est donc peu vraisemblable que les nutriments y soient transférés directement et en totalité. Le liquide exocœlomique jouerait donc le rôle de stockage d'une partie des nutriments produits par la protéolyse lysosomale dans les CESVV.

2) Approche utilisée pour la collecte de liquide exocœlomique

Le choix du stade E10,5 pour la collecte de liquide exocœlomique est un compromis entre faisabilité technique et pertinence biologique. En effet, la collecte de ce fluide est relativement simple à effectuer à E12,5 mais à ce stade, le placenta est pleinement fonctionnel et l'embryon ne se repose plus sur la nutrition histiotrophique pour se nourrir. Il serait donc difficile de tirer des conclusions d'une analyse à ce stade de développement. La collecte et l'analyse de liquide exocœlomique à un stade plus précoce (par exemple E8,5) serait très intéressante puisqu'elle permettrait d'observer des variations intervenant tôt dans la mise en place du phénotype embryonnaire ; cependant, la cavité exocœlomique au stade E8,5 et les embryons eux-mêmes sont trop petits pour que l'on puisse envisager une collecte de fluide avec le matériel dont nous disposons au laboratoire. Et quand bien même nous y parviendrions, les quantités récoltées seraient trop faibles pour être compatibles avec une analyse métabolomique telle que présentée ci-après.

Nous avons donc effectué des prélèvements de fluide exocœlomique à l'aide d'une seringue Hamilton sur des concepti au stade E10,5 immédiatement après extraction de l'utérus, selon un protocole adapté de (Huxham & Beck, 1984). Ces embryons sont issus de croisements permettant d'obtenir des échantillons de génotypes 'simple KO' (*Pqlc2* KO et *Ctns* KO), triallélique (*Ctns* +/- ; *Pqlc2* -/- et *Ctns* -/- ; *Pqlc2* +/-) et enfin DKO (ainsi que des croisements WT utilisés comme contrôles). L'intérêt d'ajouter à cette analyse les génotypes trialléliques est de pouvoir étudier la progression des altérations métaboliques depuis les simples KO jusqu'au DKO.

Nous avons envoyé ces prélèvements (N = 8 échantillons par condition, excepté le contrôle WT avec N = 10) à nos collaborateurs François Fenaille et Florence Castelli au commissariat à l'énergie atomique et aux énergies alternatives (CEA) de Saclay pour analyse par LC/MS (liquid chromatography / mass spectrometry).

b) Résultats des analyses métabolomiques

1) Validation et aspects généraux des profils obtenus

Cette analyse a permis de détecter un total de 1838 métabolites. Les données ont été soumises par nos collaborateurs à un test statistique de Wilcoxon-Mann-Whitney qui a permis de détecter, parmi ces 1838 molécules, des variations significatives par rapport au WT pour 417 d'entre elles dans les échantillons *Pqlc2* KO, 140 dans les *Ctns* KO, 221 dans les trialléliques *Ctns* +/- ; *Pqlc2* -/-, 483 dans les trialléliques *Ctns* -/- ; *Pqlc2* +/- et 471 dans les DKO. Ils ont également effectué une analyse statistique multivariée en composante principale, afin de mieux visualiser la dispersion des profils métaboliques au sein d'un génotype donné et de les comparer au WT. Les graphiques issus de cette analyse illustrant les divergences entre les différents échantillons sont disponibles en annexe 14. Ces données indiquent qu'il existe un degré de divergence croissante entre les échantillons *Ctns* KO, qui varient peu par rapport au WT, les échantillons *Pqlc2* KO et les deux situations trialléliques, qui montrent une séparation partielle par rapport au WT, et les échantillons DKO qui montrent une séparation complète par rapport au WT.

Les pics obtenus ont été annotés à partir d'une chimiothèque interne au CEA (base de données SPI) ainsi qu'à une base de données publique (base de données KEGG). Pour l'analyse présentée ci-après, nous avons choisi de nous concentrer uniquement sur les métabolites annotés dans la chimiothèque SPI du CEA, puisque leur identification repose à la fois sur la masse et le temps de rétention des molécules dans la séparation chromatographique utilisée ici, alors que la base de données publique ne tient compte que de la masse. Ainsi, le risque de mal identifier un métabolite est moindre. Cependant, l'identité de certains métabolites annotés selon cette base SPI reste ambiguë : certaines molécules sont annotées avec des identités multiples, et certaines identités sont attribuées à des molécules différentes. Pour valider l'identité des métabolites, il sera nécessaire de les refragmenter dans une nouvelle analyse LC-MS d'un échantillon de référence (fluide exocœlomique WT). Ce travail n'a pas encore été effectué.

Une fois restreint aux pics annotés dans la chimiothèque SPI, le nombre total de métabolites identifiés est passé à 113. Les valeurs obtenues pour chaque génotype ont été comparées à celles du témoin WT et soumises à un test statistique de Wilcoxon-Mann-Whitney par nos collaborateurs. Le tableau disponible en annexe 15 représente, pour chaque métabolite de cette base de données SPI, le taux de variation dans chaque génotype par rapport au WT et la probabilité obtenue avec le test statistique. Ces données montrent qu'un grand nombre de métabolites varient significativement (avec α = 5%) par rapport au témoin WT dans nos différents génotypes, à la fois positivement et négativement.

Comme on peut le voir sur le tableau, certaines molécules clef du métabolisme embryonnaire (l'acide lactique, des sucres comme le glucose et le fructose, les nucléotides) ne sont pas altérés, c'est-à-dire que leurs niveaux relatifs sont stables. On notera que cette approche ne

nous permet pas de doser les quantités absolues de chaque métabolite. Il faudrait pour cela comparer chaque molécule à un isotope lourd de concentration connue, ce qui n'est pas compatible avec le nombre important de métabolites détectés dans cette expérience.

Le lactate est un exemple particulièrement intéressant, puisqu'il s'agit du métabolite le plus représenté dans le liquide exocœlomique des embryons WT (figure 48 A). Comme on peut le voir sur la figure 48 B, les niveaux de cette molécule sont stables d'un génotype à l'autre. On observe un comportement identique pour le citrate et le panthothénate, deux molécules également fortement représentées dans le fluide exocœlomique dont les niveaux ne varient pas chez les différents mutants (figure 48 B). Cela nous permet d'exclure une contamination par d'autres fluides biologiques, et indique par ailleurs que les variations induites par les mutations sont spécifiques de processus biologiques précis et n'affectent pas le métabolome dans son ensemble.

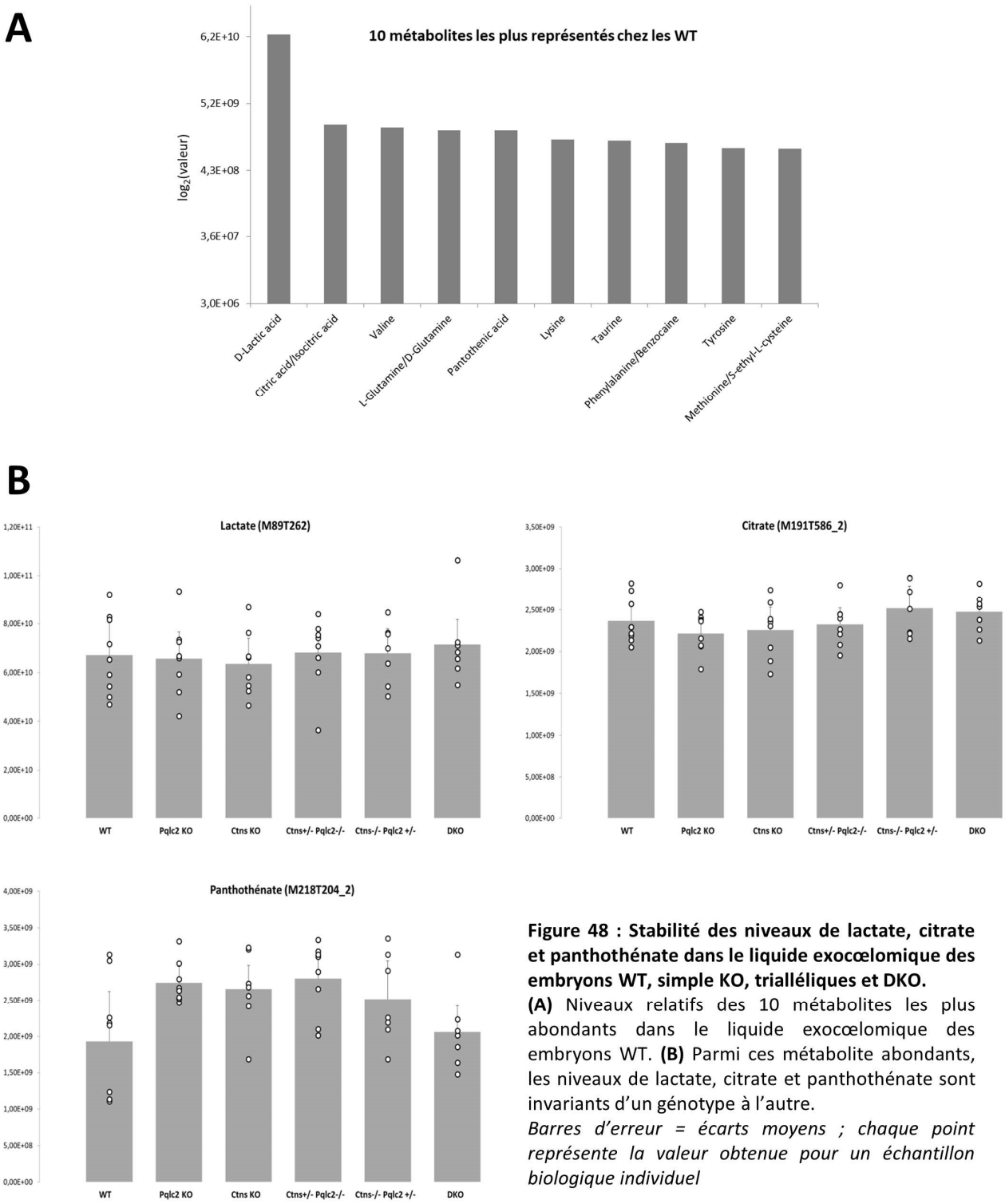


Figure 48 : Stabilité des niveaux de lactate, citrate et panthothénate dans le liquide exocœlomique des embryons WT, simple KO, trialléliques et DKO.
(A) Niveaux relatifs des 10 métabolites les plus abondants dans le liquide exocœlomique des embryons WT. **(B)** Parmi ces métabolite abondants, les niveaux de lactate, citrate et panthothénate sont invariants d'un génotype à l'autre.
Barres d'erreur = écarts moyens ; chaque point représente la valeur obtenue pour un échantillon biologique individuel

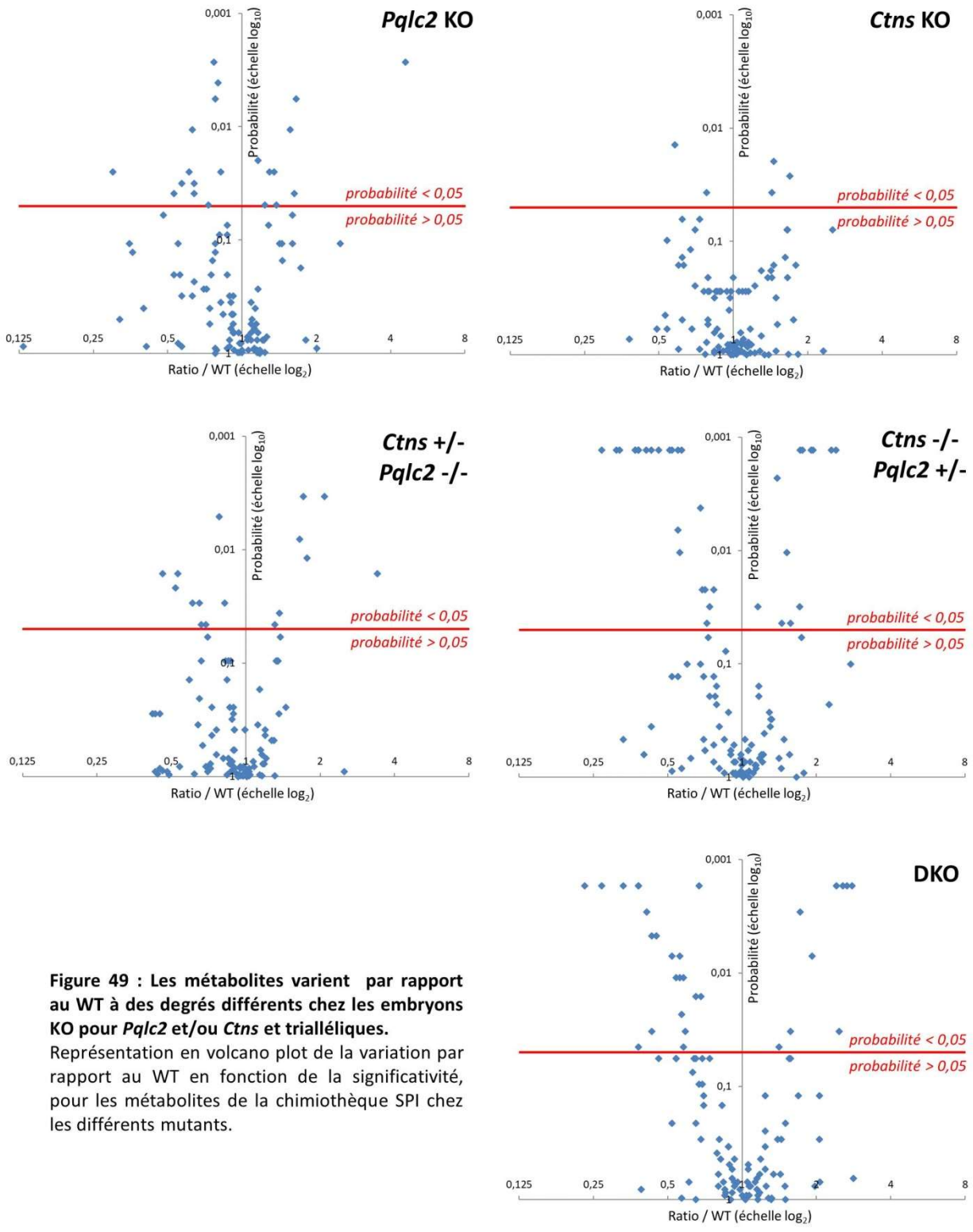


Figure 49 : Les métabolites varient par rapport au WT à des degrés différents chez les embryons KO pour *Pqlc2* et/ou *Ctns* et trialléliques.
Représentation en volcano plot de la variation par rapport au WT en fonction de la significativité, pour les métabolites de la chimiothèque SPI chez les différents mutants.

Si l'on s'intéresse au nombre de composés variant significativement parmi les métabolites de la chimiothèque SPI (voir figure 49), on s'aperçoit que l'on retrouve une tendance similaire aux résultats de l'analyse en composante principale, c'est-à-dire différents degrés de

divergence des mutants par rapport au WT, avec cependant un fait nouveau et inattendu. En effet, on observe à nouveau que le simple KO de *Ctns* induit peu de variations (5 métabolites), que le simple KO de *Pqlc2* ainsi que le triallélique *Ctns* +/- ; *Pqlc2* -/- induisent des changements significatifs de plus nombreux métabolites, et que les DKO induisent encore davantage de changements. En revanche, on constate que le génotype triallélique *Ctns* -/- ; *Pqlc2* +/- induit des changements importants, et que son profil est plus proche de celui du DKO que de l'autre triallélique.

Afin de simplifier l'analyse des données et de mieux visualiser la nature des changements associés à chaque génotype, on se focalisera dans les parties suivantes uniquement sur les métabolites dont les niveaux varient significativement par rapport au WT.

2) Impact des simple KO sur les métabolites exocœlomiques

La comparaison des KO individuels de *Ctns* et *Pqlc2* apporte deux informations importantes.

La première est que, comme mentionné précédemment, le KO de *Pqlc2* induit des changements métaboliques plus larges que le KO de *Ctns*, avec 20 métabolites dont les niveaux varient significativement chez les *Pqlc2* KO par rapport au groupe contrôle WT, contre seulement 5 chez le *Ctns* KO (figure 50 A & B). Cette observation est en contraste avec le fait que l'élargissement des vacuoles positives pour LAMP1 dans les CESVV est plus prononcé chez les *Ctns* KO que chez les *Pqlc2* KO. Il s'agit d'une information importante puisqu'elle signifie que la sévérité du phénotype vacuolaire dans les CESVV n'est pas directement corrélée à son impact sur le processus de nutrition histiotrophique.

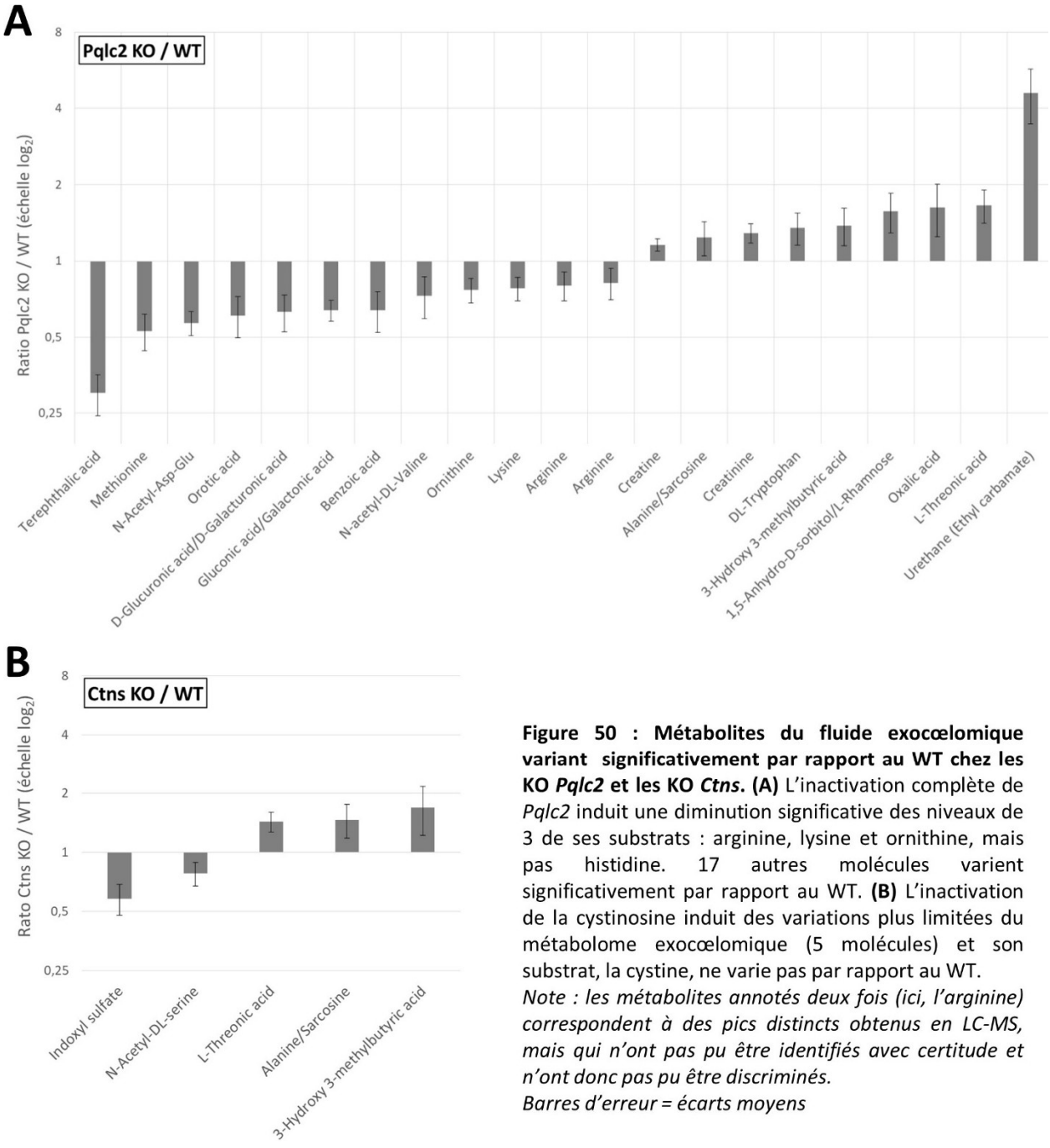


Figure 50 : Métabolites du fluide exocœlomique variant significativement par rapport au WT chez les KO *Pqlc2* et les KO *Ctns*. (A) L'inactivation complète de *Pqlc2* induit une diminution significative des niveaux de 3 de ses substrats : arginine, lysine et ornithine, mais pas histidine. 17 autres molécules varient significativement par rapport au WT. **(B)** L'inactivation de la cystinosine induit des variations plus limitées du métabolome exocœlomique (5 molécules) et son substrat, la cystine, ne varie pas par rapport au WT.
Note : les métabolites annotés deux fois (ici, l'arginine) correspondent à des pics distincts obtenus en LC-MS, mais qui n'ont pas pu être identifiés avec certitude et n'ont donc pas pu être discriminés.
Barres d'erreur = écarts moyens

La deuxième information que l'on tire de l'analyse du fluide exocœlomique des simples KO est qu'on retrouve chez le *Pqlc2* KO la 'signature' du transporteur, avec une baisse significative de trois de ses substrats (arginine, lysine et ornithine, mais pas l'histidine) par rapport au témoin WT. En revanche, surprenamment, la cystine ne varie pas significativement dans les échantillons *Ctns* KO. Ces résultats indiquent que *Pqlc2* joue un rôle direct dans l'apport de ses substrats à l'embryon. On notera cependant que son inactivation ne diminue les taux

d'acides aminés cationiques que d'environ 20% dans le fluide exocœlomique, suggérant que *PQLC2* est une voie importante, mais pas unique, d'approvisionnement de ces molécules. Par ailleurs, le fait qu'on ne retrouve pas de variation significative de la cystine indiquerait que l'embryon se procure cet acide aminé par d'autres voies (par exemple, la néosynthèse). Cette observation contraste avec le fait que la cystine soit pourtant effectivement retenue dans les lysosomes des CESVV, comme le montre l'expérience de correction par la cystéamine (figure 47). On notera cependant que cette analyse du liquide exocœlomique a révélé que d'autres métabolites non annotés varient significativement chez les *Ctns* KO (non montré), il sera donc important de les identifier dans le futur.

3) Le métabolome exocœlomique est fortement impacté chez les concepti DKO et chez les trialléliques Ctns -/- Pqlc2 +/-

3.1) Le génotype DKO induit des variations significatives de nombreux métabolites

La perte concomitante de *Ctns* et de *Pqlc2* induit une variation significative par rapport au contrôle WT des niveaux de 29 métabolites dans le fluide exocœlomique, lesquels sont listés dans la figure 51.

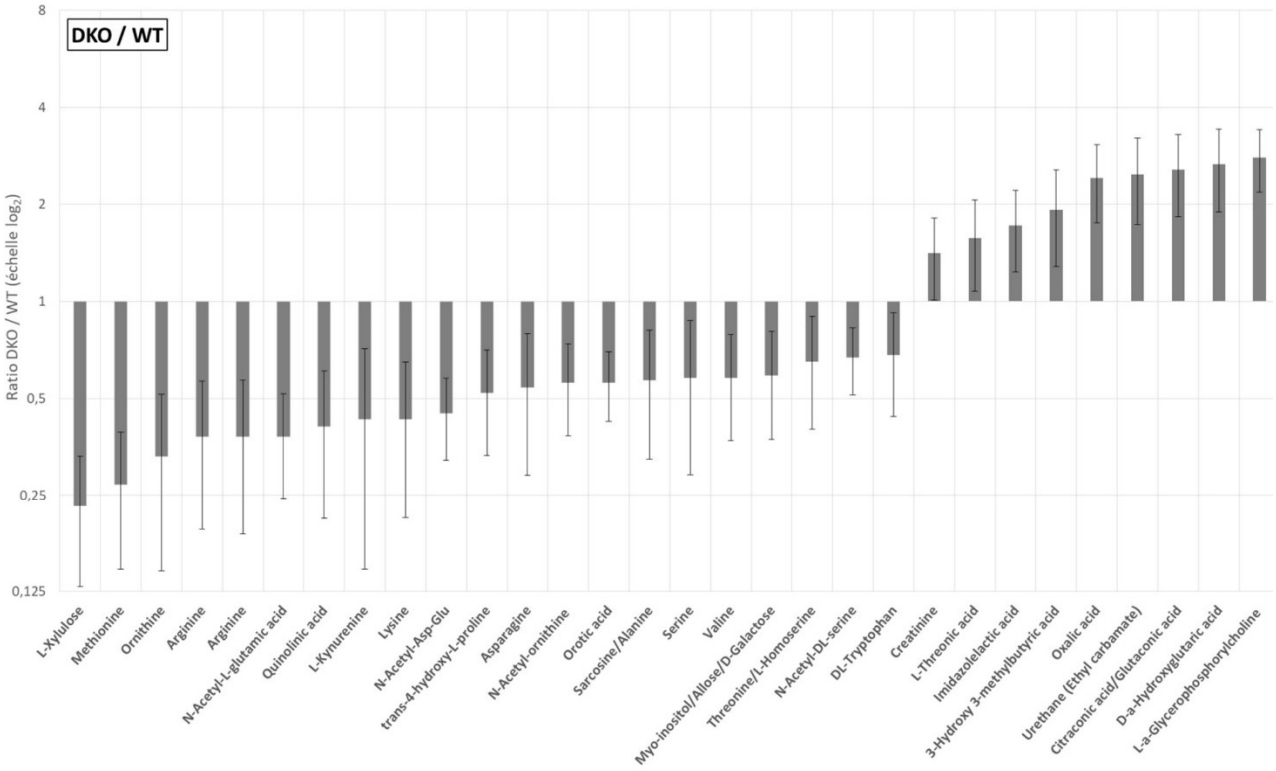


Figure 51 : Altération des taux de métabolites du fluide exocœlomique d'embryons de souris E10,5 DKO par rapport aux WT. L'inactivation concomitante de *Ctns* et *Pqlc2* induit une variation significative de 29 métabolites dans le fluide exocœlomique par rapport au WT. Parmi les molécules dont les niveaux diminuent, on trouve divers acides aminés : méthionine, ornithine, arginine, lysine, asparagine, sérine, valine, thréonine et tryptophane.
Note : les métabolites annotés deux fois correspondent à des pics distincts obtenus en LC-MS, mais qui n'ont pas pu être identifiés avec certitude et n'ont donc pas pu être discriminés.
Barres d'erreur = écarts moyens

Les métabolites dont les niveaux sont altérés chez le DKO sont de nature chimique variée : acides aminés et dérivés, sucres, courts peptides et intermédiaires de voies métaboliques. Mais les molécules les plus représentées dans ce profil métabolomique DKO sont les acides aminés (plus du tiers). Plusieurs acides aminés sont significativement diminués dans ce génotype : tryptophane (32%), thréonine (35%), valine (42%), sérine (42%), alanine (43%), asparagine (46%), lysine (57%), arginine (62%), ornithine (67%) et méthionine (73%) (figure 51 & 52). Ceci est une indication forte qu'il existe un défaut majeur de la nutrition histiotrophique, qui priverait l'embryon de ressources nécessaires à son développement, en particulier des acides aminés essentiels. On notera que le profil métabolomique DKO contient la 'signature' de *Pqlc2*, avec une baisse de la lysine, l'arginine et l'ornithine. En revanche, on n'observe pas d'altération significative des niveaux de cystine.

Certains lipides sont altérés dans le liquide exocœlomique DKO. Le myo-inositol intervient dans la synthèse des phosphatidylinositols (Bizzarri, Fuso, Dinicola, Cucina, & Bevilacqua, 2016), sa diminution dans le DKO pourrait donc avoir pour conséquence une inhibition de la synthèse du PI(3,5)P2. Or, l'absence de PI(3,5)P2 cause un élargissement des (endo)lysosomes (Krishna et al., 2016), c'est donc une cause possible de l'exacerbation du phénotype vacuolaire des CESVV DKO par rapport aux simples KOs. Inversement, la glycérophosphorylcholine est le métabolite le plus fortement augmenté dans le DKO. Il s'agit d'un produit de dégradation de la phosphatidylcholine, son accumulation pourrait donc refléter des dommages cellulaires se produisant chez l'embryon.

La diminution de certains métabolites peut être liée à la diminution de certains autres. Par exemple, la baisse de l'acide quinoléique et de la kynurénine peut être expliquée par la baisse du tryptophane (Goeden et al., 2017) ; de même, la baisse de l'acide orotique est probablement une conséquence de la baisse d'arginine (M. E. Brosnan & Brosnan, 2007).

Parmi les métabolites fortement augmentés chez le DKO, on compte l'acide citraconique et l'acide hydroxyglutarique. Il est difficile d'imaginer un lien direct entre ces molécules et l'activité de *Ctns* et *Pqlc2* ; on notera que l'accumulation d'acide hydroxyglutarique est toxique, et génère chez l'homme une pathologie appelée acidurie hydroxyglutarique (Schaftingen, Rzem, & Veiga-da-Cunha, 2009). Cependant, la composition du fluide exocœlomique reflète non seulement la production de la nutrition histiotrophique, mais aussi les produits du métabolisme embryonnaire. Il est donc possible que l'accumulation de ces molécules reflète diverses dérégulations métaboliques, mais que celles-ci soient des conséquences, et non des causes, du phénotype embryonnaire DKO.

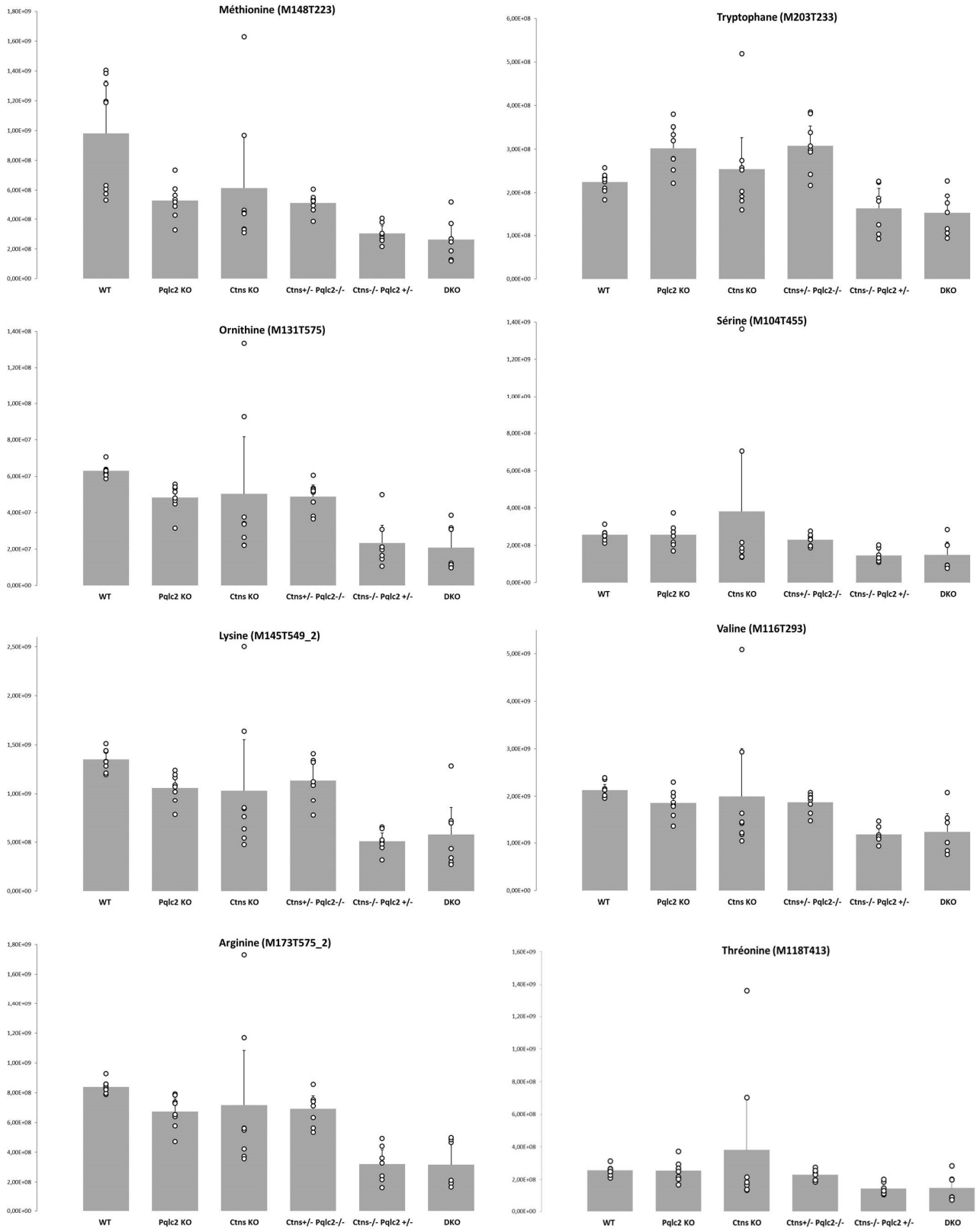


Figure 52 : Altérations des taux d'acides aminés induites par l'inactivation de *Ctns* et/ou *Pqlc2* dans le fluide exocœlomique d'embryons de souris E10,5. Le KO de *Pqlc2* induit une diminution des acides aminés qu'il transporte (ornithine, arginine, lysine, mais pas histidine). Cette diminution est exacerbée chez les DKO et les trialléliques *Ctns* -/- ; *Pqlc2* +/-, qui sont également associés à une baisse de tryptophane, sérine et valine (et thréonine, uniquement chez le DKO). La méthionine est l'acide aminé qui baisse le plus fortement chez tous les génotypes, excepté le simple KO de *Ctns* (baisse non significative). *Barres d'erreur = écarts moyens ; Points = valeur pour chaque échantillon*

3.2) Contraste entre les profils métabolomiques induits par les génotypes trialléliques

Les profils métaboliques obtenus avec les échantillons de fluide exocœlomique d'embryons trialléliques ont eux aussi fourni des informations surprenantes. Le génotype triallélique *Ctns* +/- ; *Pqlc2* -/- présente des variations par rapport au WT qui sont proches de celles obtenues avec le simple KO de *Pqlc2*, suggérant que la perte d'une copie de *Ctns* n'augmente pas notablement les variations induites par la perte de *Pqlc2* (figure 53 A).

En revanche, le génotype triallélique *Ctns* -/- ; *Pqlc2* +/- induit un profil métabolomique remarquablement proche de celui du DKO (figure 53 B). C'est d'autant plus étonnant que le simple KO de *Ctns* semble avoir relativement peu d'impact sur la composition du fluide exocœlomique contrairement au KO de *Pqlc2* (figure 50 B), du moins parmi les composés répertoriés dans la base de données SPI.

On notera que le profil métabolomique induit par ce génotype contient la 'signature' de *Pqlc2*, avec une baisse de l'arginine, la lysine et l'ornithine, et ce malgré le fait qu'une copie de *Pqlc2* soit fonctionnelle.

Ainsi, le profil métabolique du DKO traduit avant tout une perte de fonction totale de la cystinosine, qui est fortement aggravée par la perte de la fonction de PQLC2, ou sa réduction (un contexte d'haploinsuffisance de *Pqlc2* suffit à induire un profil métabolique relativement proche du DKO lorsque la cystinosine est inactivée).

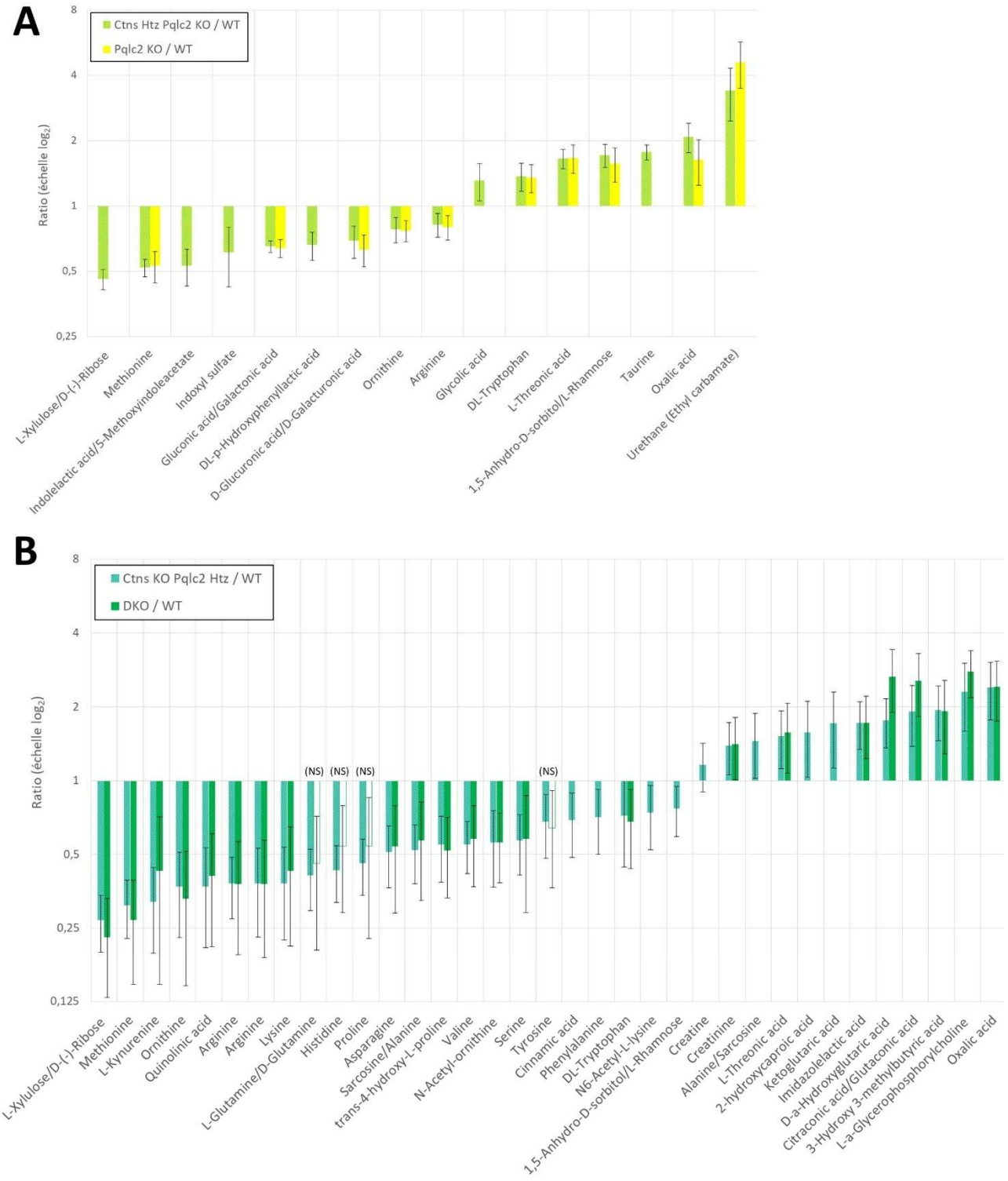


Figure 53 : Contraste entre les altération métaboliques induites par les deux situations trialléliques. Représentation du degré de variation de chaque métabolite variant significativement par rapport au contrôle. **(A)** Le triallélique *Ctns* +/- *Pqlc2* -/- induit des variations globalement cohérentes avec le simple KO de *Pqlc2* (dont les variations sont représentées pour ces métabolites à condition qu'elles soient significatives). **(B)** Le triallélique *Ctns* -/- *Pqlc2* +/- induit des variations plus nombreuses que le simple KO et *Ctns*. Le profil métabolique obtenu est proche de celui induit par le DKO, dont les variations sont représentées pour ces métabolites à condition qu'elles soient significatives (à l'exception de la glutamine, l'histidine, la proline et la tyrosine, qui varient de manière non-significative (NS) chez le DKO avec une probabilité p = 0,057).
Note : les métabolites annotés deux fois ou annotés avec deux noms différents correspondent à des pics obtenus en LC-MS qui n'ont pas pu être discriminés. Barres d'erreur = écarts moyens. Htz = +/- ; KO = -/-

4) Recherche d'une signature spécifique des échantillons DKO

Le contraste fort entre les variations métaboliques induites par chaque génotype triallélique et le fait que les changements induits par le génotype *Ctns* -/- ; *Pqlc2* +/-, c'est-à-dire celui qui est associé à la létalité partielle la plus forte, soient aussi proches de ceux induits par le DKO sont en accord avec 'l'effet de dose' des mutations de *Ctns* et *Pqlc2* sur la létalité des souriceaux à la naissance. Cela constitue une indication forte que la létalité quasi-totale du DKO et la létalité partielle sont de même nature et partageraient une origine moléculaire commune, malgré l'absence de tératogénicité des génotypes trialléliques sur les embryons. Il existerait donc un effet de seuil dans le déclenchement de la létalité, une partie des embryons trialléliques étant capables de survivre aux effets délétères de tous ces changements métaboliques (et de récupérer d'éventuels dommages), mais pas les embryons DKO qui feraient face à des altérations incompatibles avec le développement embryonnaire.

Un enjeu essentiel de cette analyse est donc de comprendre la nature de ce 'seuil' au-delà duquel les embryons ne sont plus viables, et ce malgré des profils métabolomiques très proches. Pour cela, on s'intéresse aux variations spécifiques des embryons DKO.

La figure 54 liste l'ensemble des métabolites de la chimiothèque SPI variant significativement dans le DKO par rapport au contrôle WT, ainsi que les variations dans les autres génotypes à condition qu'elles soient significatives. Cette représentation permet de visualiser à la fois les différences d'ampleur des variations de certains métabolites d'un génotype à l'autre, et également de repérer les métabolites qui ne varient que chez le DKO ou chez le DKO et le triallélique *Ctns* -/- ; *Pqlc2* +/-.

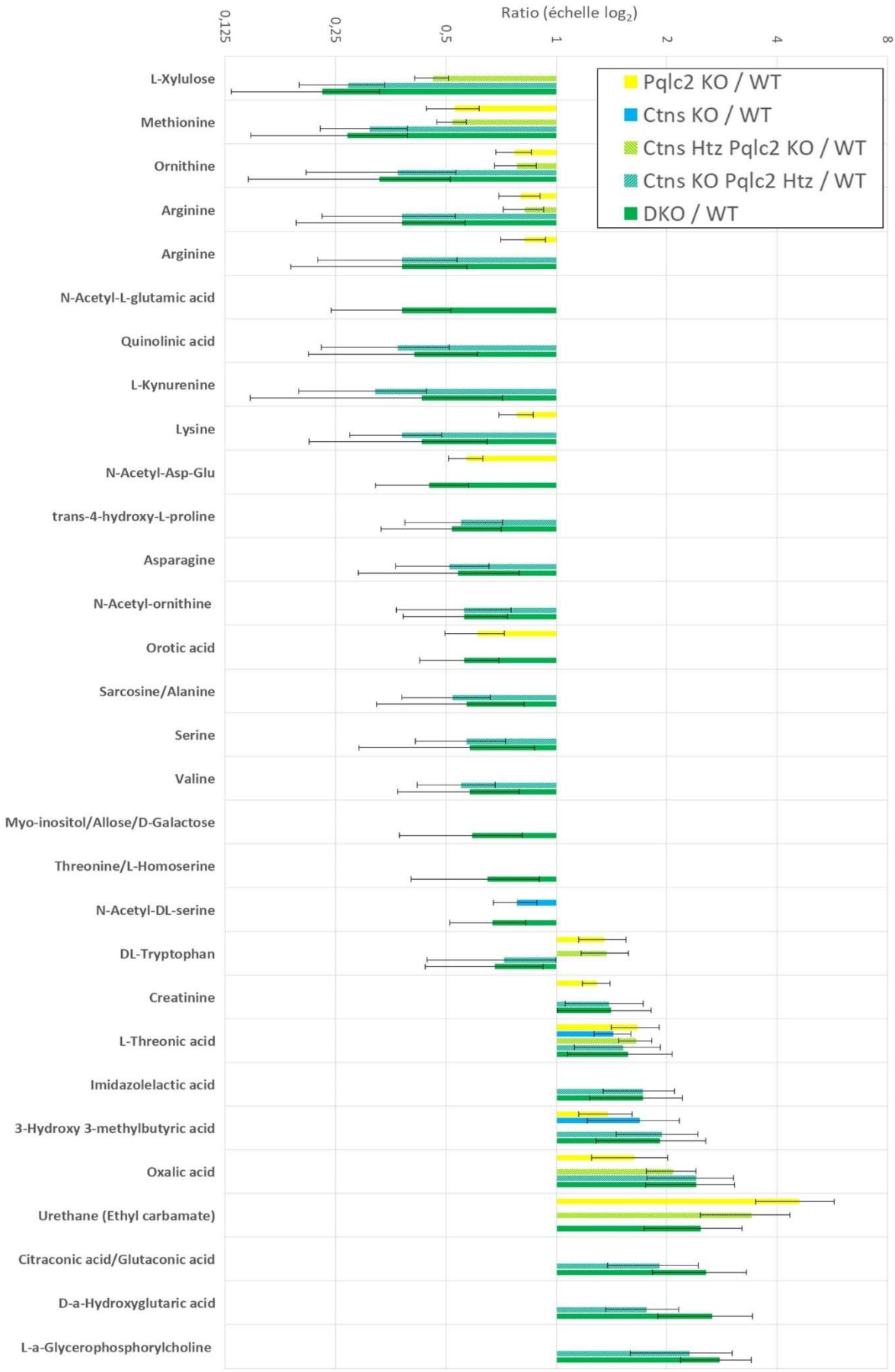


Figure 54 : Métabolites variant significativement dans le DKO. Représentation du degré de variation de chaque métabolite variant significativement chez le DKO par rapport au contrôle WT, ordonné de la plus grande baisse à la plus forte haute ; sont également représentées les variations des ces métabolites dans les autres génotypes à condition qu'elles soient significatives. *Barres d'erreur = écarts moy. Htz = +/- ; KO = -/-*

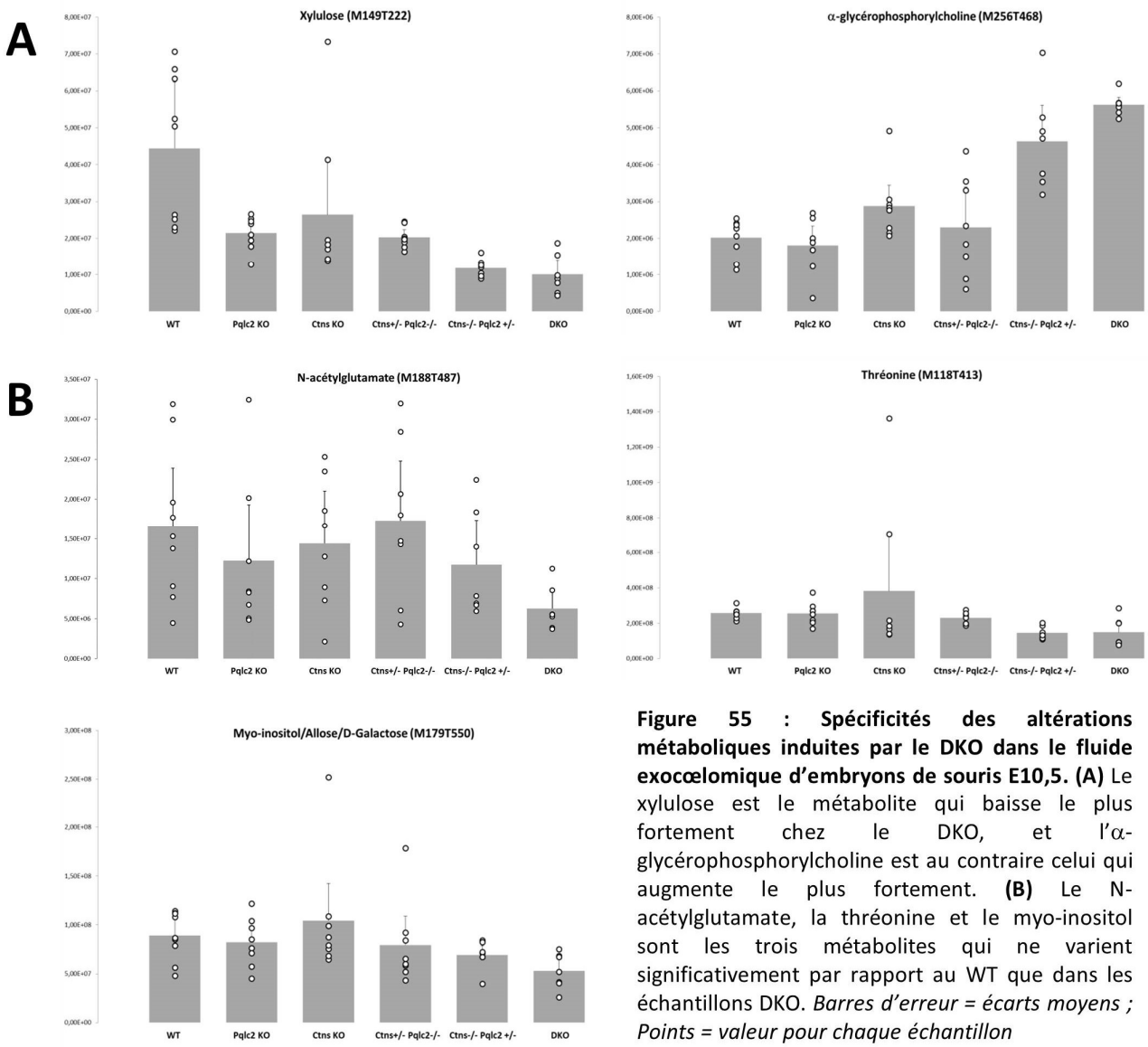


Figure 55 : Spécificités des altérations métaboliques induites par le DKO dans le fluide exocœlomique d'embryons de souris E10,5. (A) Le xylulose est le métabolite qui baisse le plus fortement chez le DKO, et l'α-glycérophosphorylcholine est au contraire celui qui augmente le plus fortement. **(B)** Le N-acétylglutamate, la thréonine et le myo-inositol sont les trois métabolites qui ne varient significativement par rapport au WT que dans les échantillons DKO. *Barres d'erreur = écarts moyens ; Points = valeur pour chaque échantillon*

La diminution des niveaux de lysine, d'arginine et d'ornithine est plus prononcée chez le DKO (57%, 62% et 73%, respectivement) que chez le *Pqlc2* KO (22%, 20% et 23% respectivement) (figures 52 & 54). Il est surprenant de constater que l'inactivation de *Ctns* exacerbe de façon aussi prononcée la baisse des substrats de *Pqlc2*. Cet effet est aussi valable pour le triallélique *Ctns* -/- ; *Pqlc2* +/-, dont le profil est très proche du DKO pour ces acides aminés.

Cette 'aggravation' des altérations du métabolome exocœlomique ne se limite pas aux acides aminés cationiques. C'est également le cas pour l'augmentation d'acide oxalique ou pour la diminution de méthionine par exemple. Cet effet est particulièrement visible pour des

métabolites dont les niveaux varient le plus fortement par rapport au témoin WT : le xylulose et l'α-glycérophosphorylcholine (figure 55 A). Par ailleurs, plusieurs métabolites ne varient significativement que chez les DKO et les trialléliques *Ctns* -/- ; *Pqlc2* +/- (acide quinoléique, kynurénine, acide citraconique, etc.) dont plusieurs acides aminés (asparagine, alanine, sérine, valine).

La variation de niveau du tryptophane est un cas singulier dans cette analyse. La perte de *Pqlc2* (que ce soit le simple KO ou le triallélique *Ctns* +/- ; *Pqlc2* -/-) induit une accumulation de cet acide aminé. A l'inverse, les génotypes DKO et triallélique *Ctns* -/- ; *Pqlc2* +/- induisent un changement de profil et les niveaux de tryptophane sont alors diminués (figure 52 & 54). Il est difficile d'imaginer une origine évidente à cette 'inversion'. En revanche, le tryptophane peut être utilisé dans la voie de la récupération de la méthionine, pour régénérer cette dernière. Ainsi, la baisse de tryptophane chez les DKO et triallélique *Ctns* -/- ; *Pqlc2* +/- est une cause possible à l'accentuation de la baisse des niveaux de méthionine chez ces génotypes par rapport au *Pqlc2* KO et au triallélique *Ctns* +/- ; *Pqlc2* -/-.

Parmi les acides aminés détectés dans cette analyse, il n'y en a qu'un qui ne diminue significativement que chez les DKO : la thréonine (figure 54 & 55 B). Or, la prolifération des cellules souches embryonnaires murines est extrêmement sensible à la privation en cet acide aminé (J. Wang et al., 2009). Ainsi, la privation en thréonine pourrait altérer la neurulation, et participer à la mise en place du phénotype embryonnaire DKO. On nuancera cependant cette observation par le fait que la baisse des niveaux de thréonine chez le DKO, bien que significative, est relativement modeste.

En plus de la thréonine, deux autres métabolites varient significativement et sélectivement dans le DKO : le myo-inositol, qui est impliqué dans la synthèse du phosphatidylinositol

comme mentionné précédemment, et le N-acétylglutamate (figure 54 & 55 B). Ce dernier composé est intéressant d'une part parce que l'arginine est un activateur de la N-acétylglutamate synthase (la baisse d'arginine induite par l'inactivation de *Pqlc2* est donc possiblement une cause directe de la baisse de ce métabolite), et d'autre part parce que le N-acétylglutamate est lui-même un régulateur allostérique de la Carbamoyl phosphate synthétase I, l'enzyme chargée de produire le carbamyl phosphate qui alimente le cycle de l'urée. La baisse conjointe de l'arginine, de l'ornithine et du N-acétylglutamate pourrait donc induire un fort ralentissement du cycle de l'urée dans l'embryon. L'expression des enzymes du cycle de l'urée débute vers E8,5 chez la souris (Takiguchi & Mori, 1995), la période pourrait donc coïncider avec l'induction du phénotype embryonnaire DKO. L'urée ne figurant pas dans les métabolites dosés en raison de sa masse trop faible, nous ne savons pas si ces niveaux sont réellement diminués mais si tel est le cas, un empoisonnement à l'ammonium serait une piste intéressante à envisager pour expliquer la létalité embryonnaire du génotype DKO.

c) Conclusions et perspectives de l'analyse métabolomique

Cette analyse a révélé un contraste entre les changements métaboliques induits par chaque simple KO et le phénotype vacuolaire induit par ces génotypes dans les CESVV. En effet, l'inactivation de *Ctns* induit un phénotype vacuolaire prononcé et homogène dans l'endoderme du sac vitellin, mais ce phénotype impacte relativement peu le métabolome exocœlomique. A l'inverse, le phénotype vacuolaire induit par le KO de *Pqlc2* dans les CESVV est plus faible et hétérogène, mais il est associé à des changements métaboliques significatifs, incluant, mais non limités aux substrats du transporteur. On a également pu noter une

différence marquée entre les effets des deux génotypes trialléliques : le génotype *Ctns* +/- ; *Pqlc2* -/- induit des changements proches du simple KO de *Pqlc2* alors que le génotype *Ctns* -/- ; *Pqlc2* +/- induit des altérations métaboliques plus larges et plus fortes, très proches de celles du DKO, en accord avec la létalité partielle plus élevée associée à ce génotype. Enfin, on a pu voir que le DKO induit une altération marquée du métabolome exocœlomique, révélatrice d'une perturbation de la nutrition histiotrophique (avec une baisse des taux d'un grand nombre d'acides aminés), ouvrant plusieurs pistes intéressantes pour proposer une base moléculaire à l'interaction génétique létale entre *Ctns* et *Pqlc2*.

En effet, on peut imaginer diverses conséquences délétères du profil métabolomique des DKO. Par exemple, on observe fréquemment une réduction de taille et des retards de croissance chez les embryons DKO. Une hypothèse simple serait qu'une carence chronique en acides aminés impacterait négativement l'activité de mTORC1, et freinerait alors la prolifération cellulaire indispensable à la croissance de l'embryon. Un contre-argument opposable à idée est que les acides aminés diminuent également fortement chez le triallélique *Ctns* -/- ; *Pqlc2* +/-, sans que l'on observe de tératogénicité chez ces embryons.

Une autre piste est celle d'une insuffisance méthionine, l'acide aminé dont les niveaux sont les plus fortement diminués chez tous les génotypes à l'exception du simple KO de *Ctns*. La méthionine est critique pour le développement embryonnaire : une étude (Sant, Dolinoy, Nahar, & Harris, 2013) a mis en évidence que l'inhibition de la protéolyse lysosomale dans le sac vitellin par la leupeptine diminue la quantité de méthionine produite par la nutrition histiotrophique, ce qui ralentit le cycle de la méthionine et freine la biosynthèse de S-adénosylméthionine (SAM) normalement utilisée comme donneur de groupements méthyl pour la méthylation de la chromatine (Serefidou, Venkatasubramani, & Imhof, 2019). La

diminution des niveaux de méthionine, comme c'est le cas dans nos échantillons DKO, perturberait ainsi la régulation transcriptionnelle de gènes développementaux. Il serait intéressant d'explorer cette piste d'un rôle dans les modifications des histones et comparer le transcriptome des embryons mutants ainsi que l'état d'ouverture de la chromatine (par CHIP-seq). Le cycle de la méthionine est particulièrement pertinent dans le contexte du DKO, puisque d'une part il participe à la synthèse du glutathion (perturbée chez le *Ctns* KO) via la voie des trans-sulfuration, et d'autre part il dépend de l'ornithine (diminuée en l'absence de *Pqlc2*) pour régénérer la méthionine dans le cycle de récupération de la méthionine (Sanderson, Gao, Dai, & Locasale, 2019). La baisse des niveaux de méthionine constituerait donc un point de convergence possible pour expliquer la synergie entre les pertes de la cystinosine et de PQLC2. Cette hypothèse sera développée dans la partie discussion.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les résultats produits durant cette thèse montrent que la cystinosine et PQLC2 coopèrent pour remplir une fonction vitale pour le développement embryonnaire, et que les cellules endodermales du sac vitellin viscéral constituent un lieu majeur de leur interaction.

La perte de ces deux transporteurs cause des anomalies morphologiques importantes du sac vitellin associées à une perturbation de sa fonction dans la nutrition histiotrophique, avec un effet de dose des mutations. Ces défauts du processus histiotrophique reflètent une perte de fonction totale de la cystinosine, accentuée par l'inactivation totale ou partielle de *Pqlc2*, soulignant là encore la coopération entre ces deux protéines.

Les altérations du métabolome exocœlomique DKO jouent vraisemblablement un rôle majeur dans l'induction de la dysmorphie de ces embryons. Cela est en accord avec les effets tératogènes connus induits par l'inhibition de la nutrition histiotrophique, que ce soit pharmacologiquement avec de la leupeptine (Freeman & Lloyd, 1983; Sant et al., 2013) ou génétiquement en inactivant *Lrp2* ou *Cubn* (Smith et al., 2006; Willnow et al., 1996). Cependant, d'autres génotypes étudiés au cours de cette thèse induisent une altération de ce processus (notamment le triallélique *Ctns* -/- ; *Pqlc2* +/-). La question de l'identification des bases moléculaires de l'interaction génétique du DKO reste donc ouverte.

Enfin, ces données ouvrent des perspectives intéressantes et de nombreuses pistes à explorer pour l'identification de nouvelles propriétés de la cystinosine et de PQLC2. Notamment, nos résultats sur lignée de cellules HAP1 montrent que plusieurs protéines impliquées dans des autophagies sélectives s'accumulent lorsque PQLC2 est inactivé.

A) Phénotype du sac vitellin : perspectives pour le traitement de la cystinose

a) Le sac vitellin viscéral : un modèle pertinent pour étudier le syndrome de Fanconi de la cystinose ?

Dans le cas de la cystinose en particulier, le phénotype vacuolaire observé dans les CESVV fait écho au syndrome de Fanconi dans les tubules contournés proximaux des reins des patients cystinotiques, un épithélium absorptif de protéines sévèrement affecté relativement tôt dans la vie des patients. Le sac vitellin possède donc une pertinence biologique particulière dans l'étude de cet aspect de la maladie, puisque qu'il absorbe les protéines par le même mécanisme (endocytose médiée par le complexe multiligand mégaline-cubiline), et possède surtout l'avantage de développer un phénotype drastique en seulement quelques jours, contre plusieurs mois pour les tubules proximaux rénaux de modèles murins de la cystinose. Il nous faudra cependant mieux détailler le spectre des défauts des sacs vitellins dépourvus de *Ctns* pour voir dans quelle mesure ils miment les défauts des cellules tubulaires proximales, et en particulier caractériser plus finement les défauts de protéolyse lysosomale que l'on observe, et leur origine.

Le syndrome de Fanconi est résistant au traitement à la cystéamine (Stephanie Cherqui, 2012). De manière similaire, nos premières tentatives de traitement de sacs vitellins *ex vivo* par la cystéamine s'étaient soldées par un échec, et il nous avait fallu augmenter drastiquement la dose et la durée de traitement pour voir une correction du phénotype vacuolaire. Cela ouvre deux perspectives très intéressantes :

1. Le fait que nous parvenions à corriger un phénotype vacuolaire drastique dans un épithélium absorptif cystinotique simplement en adaptant les doses et la durée du traitement pharmacologique est très encourageant pour le traitement de la maladie, puisqu'en effet un ajustement des modalités d'administration du médicament est une approche assez simple en principe. Cependant un obstacle à l'exploration de cette voie réside dans les propriétés pharmacologiques intrinsèques de la cystéamine : elle possède un certain degré de toxicité et une biodisponibilité importante, il n'est donc pas possible de simplement augmenter dix fois les doses ingérées par les patients. Le défi serait donc de développer une stratégie de délivrance ciblée de la molécule qui soit efficace pour augmenter la concentration du médicament sélectivement dans les reins.

2. La communauté scientifique explore par ailleurs la possibilité d'employer d'autres molécules que la cystéamine pour le traitement de la cystinose (la cystéamine induit des effets secondaires impactant négativement la qualité de vie). Les cellules endodermales du sac vitellin pourraient alors constituer un modèle intéressant pour tester l'efficacité de ces molécules.

b) Généralisation à d'autres maladies de stockage lysosomal ?

La découverte d'un phénotype vacuolaire dans les cellules endodermales du sac vitellin dans deux modèles murins KO pour des transporteurs lysosomaux soulève une autre question intéressante : ce phénomène est-il généralisable à d'autres maladies de surcharge lysosomale

(MSL) ? En effet, la voie d'endocytose et la dégradation lysosomale sont extrêmement actives et d'une importance cruciale dans les cellules endodermales de ce tissu. Il est donc tout à fait envisageable que le moindre défaut des compartiments (endo)lysosomaux y soit amplifié et rendu visible de manière beaucoup plus évidente.

Outre l'utilisation de ces cellules comme modèle pour la détection d'altérations de la voie d'endocytose, il serait intéressant de voir si les maladies de surcharge lysosomale ont en commun une fragilité accrue de la nutrition histiotrophique, et donc du développement embryonnaire durant la neurulation. En effet, plusieurs MSL comme la maladie de Gaucher, la maladie de Niemann-Pick de type C ou certaines mucolipidose de type IV possèdent une dimension neurodégénérative (Onyenwoke & Brenman, 2015). Des défauts de neurulation pourraient être asymptomatiques mais entrainer une vulnérabilité accrue du système nerveux à l'âge adulte. Il serait donc intéressant d'envisager une origine congénitale des symptômes neurologiques dans les MSL.

Enfin, si l'inactivation d'autres protéines lysosomales induit un phénotype vacuolaire similaire dans les CESVV, on pourrait envisager l'existence d'autres interactions synthétiques létales. En particulier, il serait intéressant de tester si le double KO de *Ctns* et d'un autre transporteur lysosomal (d'acides aminés ou d'un autre type de molécule) induit une létalité embryonnaire. Si c'est le cas, cela pourrait mettre en lumière un rôle particulier partagé par les transporteurs lysosomaux au sein de la cellule, et plus largement dans le développement embryonnaire. On citera un exemple intéressant chez *C. elegans* : le double KO de *laat-1* (orthologue de PQLC2) et de *ctns-1* n'est pas synthétique létal (Liu et al., 2012) ; en revanche, le double KO de *laat-1* et de *slc36.1* (orthologue de LYAAT1, un transporteur lysosomal d'acides aminés neutres) est synthétique létal chez cet organisme (Gan et al., 2019). La recherche d'autres interactions

létales de transporteurs lysosomaux est donc une piste prometteuse, mais ce phénomène est vraisemblablement très dépendant de l'organisme étudié.

B) Identification de nouvelles propriétés biologiques de PQLC2

a) Un rôle de Pqlc2 dans la modulation de la microautophagie ?

Les observations faites dans plusieurs systèmes biologiques au cours de ces travaux de thèse ont fourni des indications qui peuvent être interprétés collectivement en proposant une nouvelle fonction inattendue de PQLC2.

1) Les leçons du l'approche réductionniste sur cellules HAP1

Dans les cellules HAP1 PQLC2 KO, on observe une accumulation des récepteurs d'autophagie sélective TAX1BP1 et NDP52, de l'ubiquitine-ligase NDFIP1 et de la protéine adaptatrice p62 (qui sont toutes deux également impliquées dans des autophagies sélectives), par rapport au témoin WT en condition basales. Lors d'une carence en acides aminés, ces protéines sont dégradées rapidement par microautophagie (Mejlvang et al., 2018) et cette réponse ne semble pas affectée dans les cellules PQLC2 KO.

Mon laboratoire d'accueil cherche actuellement à comprendre dans quelle mesure le flux basal de dégradation de ces protéines, c'est-à-dire non-induit par une carence, dépend ou non

du mécanisme de microautophagie. Il faudra aussi examiner si l'augmentation des niveaux de ces protéines correspond à un défaut de dégradation ou à une synthèse accrue, éventuellement à une augmentation de l'activité transcriptionnelle des gènes codant ces protéines. Si l'accumulation de ces protéines traduit une réduction de leur microautophagie basale en absence de PQLC2, ce mécanisme sera étudié plus avant en examinant l'implication du complexe ESCRT (qui joue par ailleurs un rôle central dans la réponse induite par la carence en acides aminés).

2) Les leçons de l'analyse morphologique du sac vitellin

Dans les cellules endodermales des sacs vitellins de souris *Pqlc2* KO, on observe un élargissement des compartiments marqués par LAMP1 (lysosomes et/ou vacuoles apicales) par rapport aux WT. On ne peut pas écarter que l'élargissement de ces compartiments soit une conséquence indirecte de la rétention des substrats de *Pqlc2*. Cela semble cependant peu probable compte tenu de l'absence de phénotype lysosomal évident dans les cellules de souris *Pqlc2* KO adultes et de l'absence d'accumulation d'acides aminés cationiques dans plusieurs de leurs tissus (Xavier Leray, données non publiées). De plus, PQLC2 n'est pas la seule voie de passage de ces acides aminés à travers la membrane lysosomale (figure 18).

Cependant, une hypothèse simple permettant d'expliquer ce phénomène serait un défaut dans le cycle de fusion/fission des lysosomes. D'une part, une conséquence directe du blocage de la fission lysosomale, par exemple par inhibition pharmacologique de PIKfyve, est l'élargissement des compartiments endolysosomaux (Krishna et al., 2016). Il est intéressant de noter que le complexe ESCRT joue un rôle dans la fission des endosomes (Allison et al.,

2013; McCullough et al., 2015) ce qui pourrait constituer une piste pour expliquer le phénotype. D'autre part, dans les CESVV, les endosomes contenant les sécrétions maternelles sont internalisés dans les vacuoles apicales par un mécanisme similaire à de la microautophagie (Kawamura et al., 2012). Un défaut de ce processus conduirait à la formation de vacuoles anormales, élargies et incapables de remplir pleinement leur fonction dégradative, ce qui est cohérent avec nos observations.

ESCRT intervient également dans la réparation de la membrane lysosomale (Skowyra et al., 2018), on peut donc imaginer dans le cadre du phénotype DKO qu'une défaillance de ce système de réparation associée à des dégâts membranaires causés par des cristaux de cystine fragiliserait les lysosomes ; ces derniers devant alors être éliminés par lysophagie, la cellule se retrouverait alors incapable de faire face au flux de protéines endocytées et ne remplirait plus sa fonction.

3) Les leçons de l'analyse du métabolome exocœlomique

L'analyse du profil métabolomique des fluides exocœlomiques d'embryons de souris a révélé que la perte de *Pqlc2* induit une diminution significative des niveaux de 3 de ses substrats (arginine, lysine et ornithine), mais aussi d'un autre acide aminé que PQLC2 ne transporte pas : la méthionine, qui est d'ailleurs l'acide aminé dont les niveaux diminuent le plus fortement chez le simple KO *Pqlc2*.

De manière intéressante, les travaux du groupe d'Edward De Robertis (Albrecht, Bui, & De Robertis, 2019; Albrecht, Ploper, Tejeda-Muñoz, & De Robertis, 2018) établissent un lien entre

la disponibilité en méthionine et les voies de signalisation induites par le morphogène Wingless Integrated (Wnt). La liaison de Wnt à ses récepteurs Frizzled et LRP5/6 induit l'activation de la voie d'endocytose et la formation de vésicules intraluminales (ILV) dans lesquels sont séquestrés certains membres du complexe de destruction de la β-caténine, dont la kinase GSK3. Ils montrent que ce processus est aboli par l'absence de méthionine, et plus exactement par sa conséquence directe qui est une diminution des niveaux de S-adénosylméthionine (SAM), un donneur de méthyl qui intervient dans de nombreuses réactions. Notamment, la SAM est utilisée comme donneur de méthyl par la Protein Arginine Methyl Transferase 1 (PRMT1), dont l'activité facilite la phosphorylation (par un mécanisme mal connu) et la séquestration dans des ILV des cibles cytosoliques de Wnt.

Or, la formation de ces ILV se fait par microautophagie, et elle dépend de l'activité du complexe ESCRT. Wnt pourrait donc jouer un rôle activateur de ce processus. Actuellement, nous ne savons pas pour quelle raison la perte de *Pqlc2* entrainerait une diminution des niveaux de méthionine. Une possibilité serait que la diminution d'ornithine, causée soit directement par la perte de l'activité de PQLC2 (Jezegou et al., 2012), soit indirectement par la baisse d'arginine, défavoriserait la production des polyamines intervenant dans le cycle de récupération de la méthionine (figure 57). Nous n'avons pas de preuve de cela actuellement. On notera cependant que le tryptophane baisse significativement dans le DKO, alors qu'il augmente dans le simple KO de *Pqlc2* ; or, le tryptophane est utilisé dans une étape de transamination de la voie de récupération de la méthionine (Albers, 2009). Cela pourrait expliquer la diminution accrue de la méthionine dans les fluides exocœlomiques DKO par rapport aux *Pqlc2* KO.

Une étude récente a identifié et caractérisé un transporteur primaire lysosomal de polyamines : ATP13A2 (van Veen et al., 2020). Lorsque des polyamines sont endocytés par la cellule, ce transporteur permet leur passage à travers la membrane endolysosomale. Cette fonction est particulièrement importante pour prévenir l'accumulation de polyamines dans les lysosomes, qui perturbe leur fonction et est cytotoxique. On pourrait envisager que le DKO impacte négativement les régulateurs de ATP13A2 (l'ATP et le PI(3,5)P2) et participe ainsi à l'apparition des défauts de protéolyse dans les CESVV. Nous n'avons cependant pas de visibilité sur les variations des niveaux des polyamines dans le liquide exocœlomique à l'heure actuelle, or cela sera indispensable pour confirmer ou infirmer l'hypothèse que la baisse de méthionine est causée par un défaut du cycle de récupération de la méthionine (figure 57). Nous ne savons pas non plus si des polyamines sont présentes dans les sécrétions endométriales endocytées par le sac vitellin.

4) Une nouvelle fonction de Pqlc2 ?

L'ensemble de ces observations tendent à indiquer que *Pqlc2* pourrait influencer l'activité du complexe ESCRT et la microautophagie, probablement d'une manière indirecte via l'influence des concentrations de méthionine sur l'activité Wnt (figure 56). Les données de métabolomique offrent un prisme de lecture puissant pour la compréhension de la mise en place du phénotype, et donnent du crédit à l'hypothèse d'un défaut de la machinerie ESCRT. Cependant ces données ont été obtenues à la fin de ma thèse. Nous n'avons donc pas eu le temps de tester ces différentes hypothèses et notamment l'influence de la signalisation Wnt.

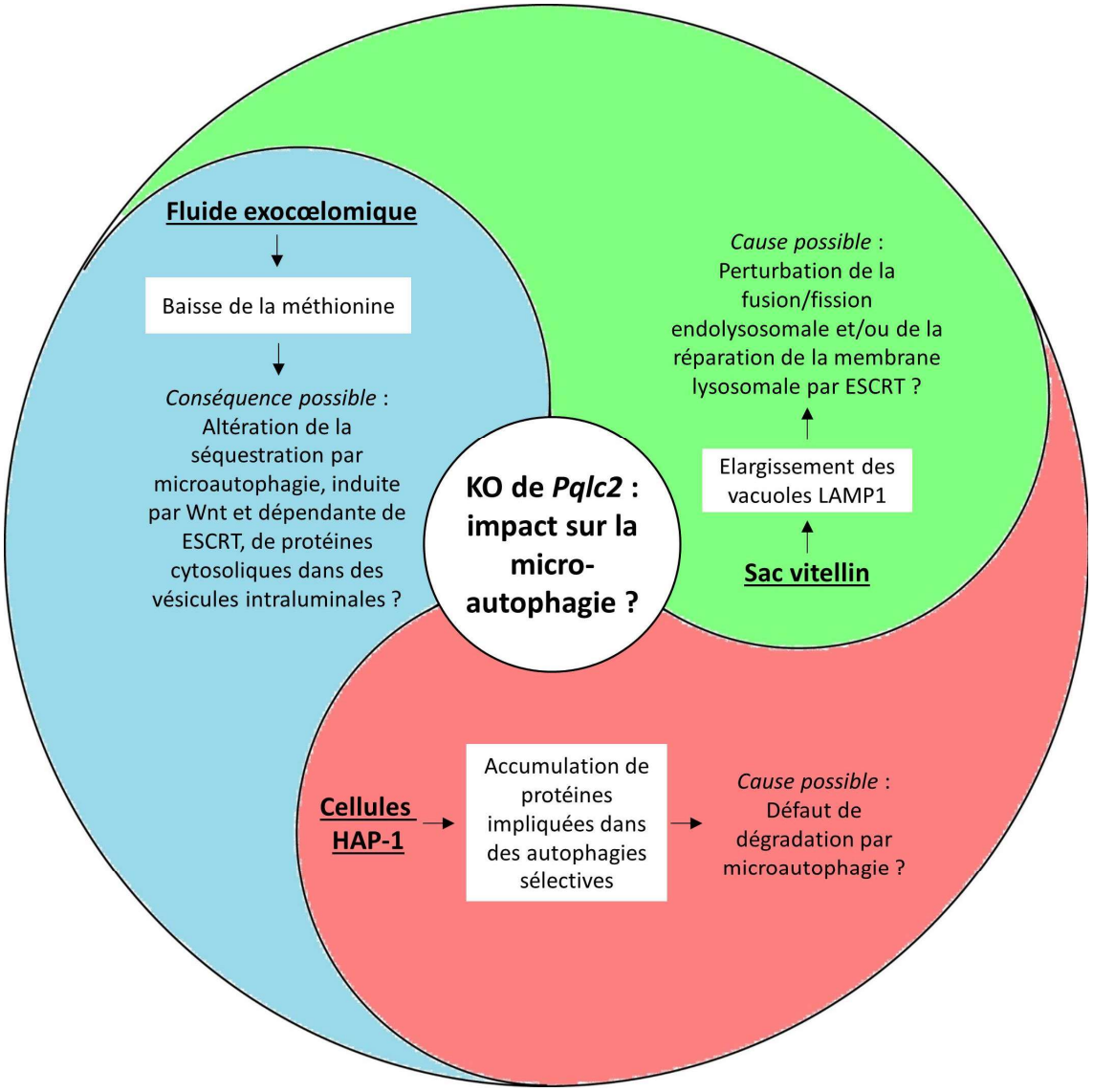


Figure 56 : Conséquences de l'inactivation de Pqlc2 dans différents systèmes biologiques.
PQLC2 joue-t-il un rôle dans la microautophagie et l'activité du complexe ESCRT ?

b) Rôle signalétique de PQLC2 et du complexe C9orf72 ?

PQLC2 est nécessaire au recrutement du complexe C9orf72-SMCR8-WDR41 à la surface des lysosomes lors d'une carence en acides aminés (Joseph Amick et al., 2020). Cependant, la fonction jouée par ce complexe à la surface des lysosomes est encore inconnue. Compte tenu de l'implication de C9orf72 dans la sclérose latérale amyotrophique et dans les démences frontotemporales, il est probable qu'il remplisse une fonction critique dans la cellule.

L'avantage d'étudier le KO de PQLC2 dans ce contexte est justement qu'il permet de limiter les observations uniquement aux rôles remplis par le complexe à la surface des lysosomes. Notre équipe essaie actuellement d'implémenter un outil permettant de visualiser en fluorescence le recrutement de C9orf72 aux lysosomes. Une piste possible qui ferait le lien entre C9orf72 et le phénotype observé dans les sacs vitellins est la petite GTPase Arl8b, responsable de la mobilité des lysosomes vers la périphérie cellulaire, et dont la perte cause un phénotype d'élargissement des vacuoles apicales similaire à celui qu'on observe avec nos mutants (Oka et al., 2017). Or, C9orf72 et SMCR8 possèdent probablement une activité de facteurs d'échange nucléotidique de guanine (Guanine nucleotide Exchange Factors, GEF) ou de protéines activatrices de GTPases (GTPase-Activating Proteins, GAP), bien que leurs cibles n'aient pas encore été identifiées. Il serait donc intéressant d'interroger la capacité du complexe C9orf72 à activer cette GTPase à la surface des lysosomes.

C) Bases moléculaires possibles de la convergence entre *Ctns* et *Pqlc2*

a) La létalité du DKO est-elle causée par une dérégulation métabolique ?

L'analyse de la composition des fluides exocœlomiques a révélé que les concentrations de nombreuses molécules sont altérées de façon importante dans le DKO, et la baisse de certaines d'entre elles pourrait refléter des dérégulations majeures de voies métaboliques (figure 57). Notamment, le cycle de récupération de la méthionine (réduction du cycle conduisant à une diminution de cet acide aminé), ou encore le cycle de l'urée (réduction consécutive à une diminution de l'arginine et de l'ornithine) pourraient être impactés.

1) Le cycle de la méthionine et l'activité Wnt : un point de convergence possible entre les activités de la cystinosine et de PQLC2 ?

La méthionine est l'acide aminé du liquide exocœlomique le plus fortement diminué par rapport au WT tous les génotypes que nous avons testés, à l'exception du simple KO de *Ctns*. La SAM formé dans le cycle de la méthionine est utilisée pour diverses réactions de méthylation, dont la méthylation des histones qui gouverne l'état d'ouverture de la chromatine, et donc, le transcriptome. Comme mentionné dans la partie résultats, une étude a rapporté que l'inhibition de la protéolyse lysosomale dans le sac vitellin réduit les quantités de SAM formées et la méthylation de l'ADN, et *in fine* altère le contrôle épigénétique des programmes développementaux (Sant et al., 2013). Il serait ainsi possible de relier la diminution de méthionine aux défauts développementaux.

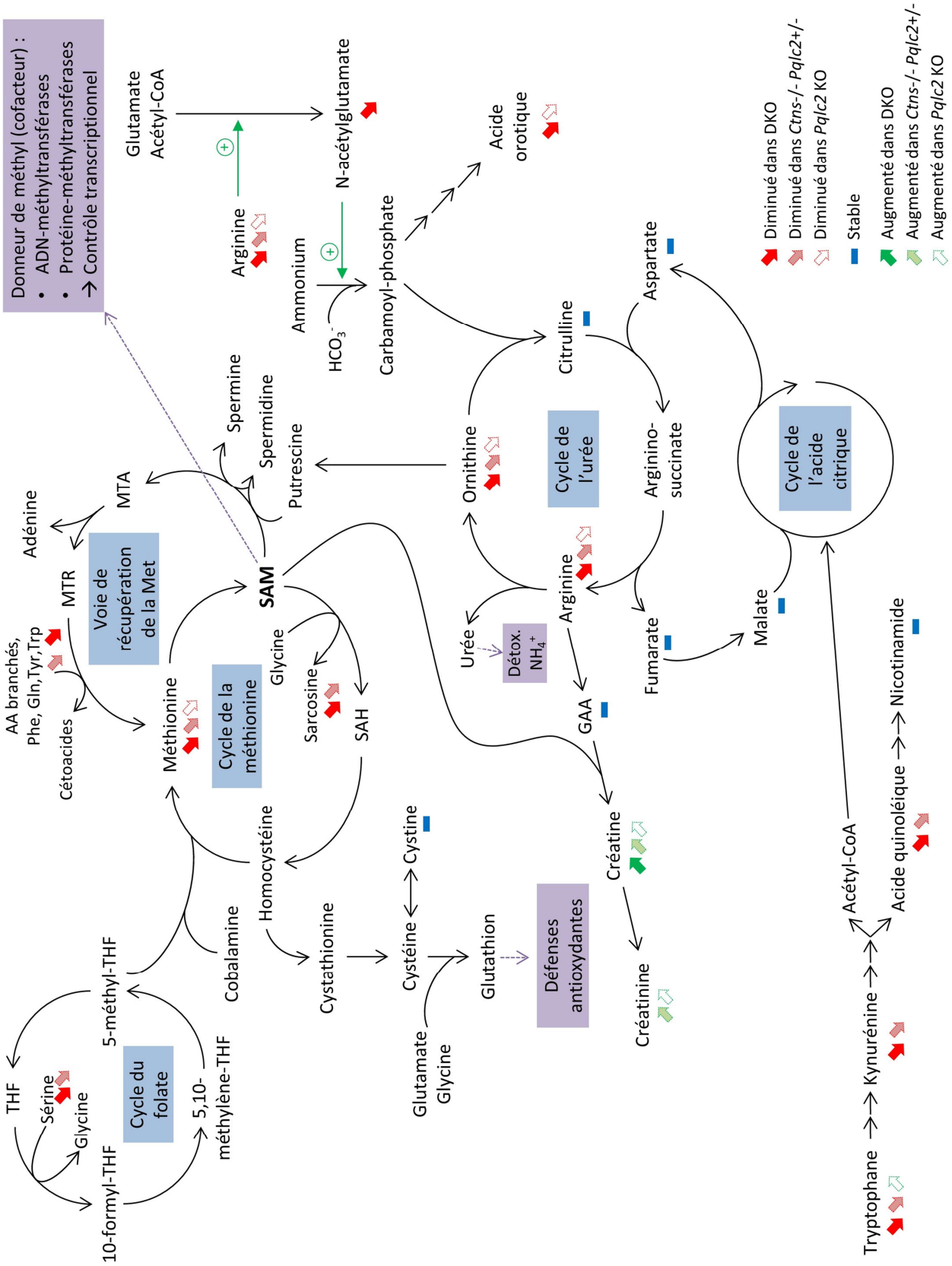


Figure 57 : Vue d'ensemble des voies métaboliques (simplifiées) affectées chez les embryons *Pqlc2* KO, les trialléliques *Ctns* -/- ; *Pqlc2* +/-, et les DKO.

GAA = Acide Guanidoacétique ; MTA = Méthylthioadénosine ; MTR = Méthylthioribose ; SAH = S-adénosyl-homocystéine ; SAM = S-adénosyl-méthionine ; THF = Tétrahydrofolate

Cependant, le génotype DKO n'est pas le seul à induire une diminution des niveaux de méthionine. C'est aussi le cas du triallélique *Ctns* -/- ; *Pqlc2* +/-, et dans une moindre mesure du triallélique *Ctns* +/- ; *Pqlc2* -/- et du simple KO de *Pqlc2*. Or, nous n'avons jamais observé d'embryons dysmorphiques avec ces génotypes.

Il est possible d'imaginer un lien direct entre la perte de *Pqlc2* et la baisse des niveaux de méthionine : la diminution des niveaux d'arginine et surtout d'ornithine bloquerait la synthèse des polyamines (putrescine, spermidine, spermine), ce qui freinerait la voie de la récupération de la méthionine. Une possibilité pour expliquer comment la perte de la cystinosine aggrave la baisse de méthionine serait que l'absence de cystinosine diminue la quantité de cystine (et sa forme réduite, cystéine), et qu'en réponse l'homocystéine soit mobilisée pour régénérer la cystéine plutôt que la méthionine. Une limite à cette hypothèse est que l'on ne détecte de variations significatives ni de la méthionine, ni de la cystine dans le simple KO de *Ctns*.

Dans la partie précédente, on évoquait la possibilité que la baisse des niveaux de méthionine observée lorsque *Pqlc2* est inactivé ait pour conséquence une perturbation de la capacité de Wnt à induire la microautophagie (utilisée ici pour séquestrer GSK3 dans la voie canonique). Cette piste est particulièrement intéressante puisqu'une perturbation de l'activité de Wnt pourrait représenter le point de convergence fonctionnelle de *Ctns* et *Pqlc2* sous-jacent au problème de létalité synthétique : en effet, une pré-publication récente du groupe de Norbert Perrimon (doi.org/10.1101/606541) indique que la perte de la cystinosine impacte négativement la formation d'acétyl-coenzyme A (Acétyl-CoA), lequel est nécessaire à l'activation de Wnt par acylation (Doubravska et al., 2011; Kakugawa et al., 2015; Nile & Hannoush, 2016).

Un modèle attractif serait donc que la perte de Ctns diminue le niveau global d'activation de Wnt, et que la baisse des niveaux de méthionine induite par la perte de Pqlc2 inhibe la capacité de Wnt à induire la microautophagie. La combinaison de ces deux défauts perturberait alors fortement les programmes développementaux contrôlés par ce morphogène, induisant des malformations chez les embryons DKO. En effet, l'inactivation des différentes isoformes de Wnt et de ses récepteurs induit un ensemble varié de phénotypes embryonnaires délétères (van Amerongen & Berns, 2006). Notamment, Wnt intervient dans la formation de l'épithélium pigmentaire rétinien (Fujimura, 2016), qui ne se forme pas chez les embryons DKO (figure 24).

2) Hypothèse d'un empoisonnement à l'ammonium comme cause de létalité

L'analyse des fluides exocœlomiques des embryons a révélé que, au sein de la chimiothèque interne de nos collaborateurs, seuls 3 métabolites ne varient significativement que chez le DKO. Parmi eux, on trouve le N-acétylglutamate. Or cette molécule possède un rôle crucial dans la détoxification de l'ammonium, puisqu'elle agit comme régulateur allostérique de la carbamoyl phosphate synthétase, l'enzyme qui catalyse la formation de carbamoyl phosphate à partir de l'ammonium. Le carbamoyl phosphate rentre ensuite dans le cycle de l'urée ; *in fine*, l'ammonium est éliminé sous forme d'urée (figure 57). Dans la cellule, le N-acétylglutamate augmente en réponse aux quantités d'ammonium générées durant la protéolyse. En effet, la glutaminase génère à la fois de l'ammonium et du glutamate, l'un des substrats nécessaire à la synthèse de N-acétylglutamate (J. T. Brosnan, 2000).

Un défaut de formation du carbamoyl phosphate pourrait constituer un point de convergence de l'inactivation de *Ctns* et *Pqlc2*. En effet, le KO de *Pqlc2* diminue les niveaux d'arginine. Or cet acide aminé est un régulateur positif de l'activité de la N-acétylglutamate synthase, l'enzyme qui catalyse la formation de N-acétylglutamate à partir de glutamate et d'acétyl-CoA. Le KO de *Ctns* diminuerait de son côté la disponibilité en acétyl-CoA (P. Jouandin, pré-publication doi.org/10.1101/606541).

Ainsi, la réaction de formation de formation du N-acétylglutamate serait bloquée par l'indisponibilité d'un des substrats et par une activité moindre de l'enzyme catalysant la réaction. La synthèse de carbamoyl phosphate serait à son tour inhibée, et l'ammonium produit par l'embryon ne pourrait alors plus rentrer dans le cycle de l'urée pour être détoxifié. L'accumulation d'ammonium deviendrait alors toxique pour les embryons DKO et perturberait leur développement.

Malheureusement, l'acétyl-CoA, le carbamoyl phosphate et l'urée ne figurent pas dans la liste des métabolites identifiés dans notre analyse. La diminution des niveaux d'acide orotique est cependant un indice encourageant, puisque sa formation dépend en partie du carbamoyl phosphate (M. E. Brosnan & Brosnan, 2007).

Cette hypothèse d'un empoisonnement à l'urée ouvre des perspectives expérimentales intéressantes. Nous allons initier différentes expériences de traitement *in vivo* sur des souris gravides avec des outils pharmacologiques permettant de détoxifier artificiellement l'ammonium, et nous allons tester dans un premier temps le benzoate de sodium et le phénylacétate de sodium (De Las Heras, Aldámiz-Echevarría, Martínez-Chantar, & Delgado, 2017). Si notre hypothèse est la bonne, nous pouvons espérer prévenir la létalité du génotype DKO.

b) Dérégulation possible de mTORC1 chez les DKO ?

Plusieurs éléments suggèrent qu'un défaut d'activation du régulateur de la croissance cellulaire mTORC1 pourrait constituer un troisième point de convergence possible de la perte de *Ctns* et *Pqlc2* :

- Le rôle de ces transporteurs dans l'activation de mTORC1 en réponse aux acides aminés a été rapporté dans la littérature (Joseph Amick et al., 2020; Andrzejewska et al., 2016).
- Le DKO induit une diminution forte de plusieurs acides aminés dans le fluide exocœlomique, or les acides aminés influencent fortement le recrutement de mTORC1 aux lysosomes.
- Les embryons DKO présentent des retards de croissance et une taille réduite, ce qui pourrait traduire une diminution de l'activité de mTORC1.
- Il existe une boucle de régulation positive entre mTORC1 et l'expression de *Lrp2* (Gleixner et al., 2014), le gène codant pour la mégaline, qui joue un rôle crucial dans l'internalisation des protéines sécrétées par les glandes utérines dans les CESVV.

Il est envisageable de tester cette hypothèse en mesurant l'activation des cibles de la voie mTORC1 (phosphorylation des protéines 4EBP1 ou S6 par exemple) sur les embryons DKO, mais il nous faudrait pour cela travailler à un stade plus précoce de développement (E8,5) pour nous rapprocher de la cause primaire. En effet, même si on visualisait un effet à E10,5, on ne pourrait pas discriminer s'il s'agit d'une cause ou bien d'une conséquence indirecte, compte tenu du phénotype drastique déjà établi à ce stade.

c) Le sac vitellin est-il le seul lieu de l'interaction génétique entre *Ctns* et *Pqlc2* ?

Il serait intéressant de déterminer si la cystinosine et PQLC2 interagissent fonctionnellement dans d'autres types cellulaires que les CESVV. Il faut également envisager que l'interaction ne soit pas nécessairement autonome sur le plan cellulaire, c'est-à-dire que l'inactivation de Ctns (par exemple) dans un type cellulaire puisse aggraver les conséquences de l'inactivation de *Pqlc2* dans un autre type cellulaire, et inversement.

Nous allons tester si l'expression de *Ctns* dans le sac vitellin permet de corriger la létalité embryonnaire du DKO grâce à une lignée murine transgénique KI que nous faisons créer, dans laquelle *Ctns* est placé sous le contrôle du promoteur de la transthyrétine (Ttr). En effet, il est important de savoir si les défauts embryonnaires résultent des fortes altérations observées dans le sac vitellin, et si ce n'est pas le cas, quel est le degré de participation de la nutrition histiotrophique. Si cette expérience de sauvetage réussit, nous aurons obtenu un modèle de souris intéressant en cela que chez les individus adultes, certains organes seront DKO quand d'autres seront uniquement KO pour *Pqlc2.* Ces souris permettront aussi d'objectiver l'importance de la fenêtre temporelle du processus dans lequel ces deux transporteurs lysosomaux sont impliqués. En effet, Ttr ne s'exprime chez l'embryon que dans les dérivés de l'endoderme, donc dans les CESVV en premier lieu, puis, plus tard, dans les organes digestifs (Kwon & Hadjantonakis, 2009).

Si l'on considère les effets tératogènes connus de l'inhibition de la nutrition histiotrophique (que ce soit par inhibition pharmacologique de la protéolyse lysosomale ou par inactivation génétique de protéines essentielles à la fonction des CESVV), on peut supposer que l'ampleur

des défauts morphologiques et fonctionnels des sacs vitellins d'embryons DKO est une explication suffisante à la dysmorphie des embryons. Cependant, nos observations se placent dans cette étude à E10,5 : il serait donc intéressant de poursuivre les expériences préliminaires effectuées sur des embryons plus précoces (E8,5) et étudier le phénotype des CESVV à ce stade.

De plus, l'hypothèse que la perte de *Ctns* et *Pqlc2* puisse affecter l'activité du morphogène Wnt (bien qu'elle reste à prouver) suggère que l'interaction génétique entre la cystinosine et PQLC2 puisse avoir lieu dans d'autres cellules que les CESVV, en particulier qu'elle se produise dans l'embryon. A ce titre, il sera intéressant d'examiner de manière approfondie les embryons DKO obtenus après ré-expression de la cystinosine sous le contrôle du promoteur Ttr pour voir si des défauts particuliers persistent, révélant ainsi d'autres sites d'interaction fonctionnelle entre les deux transporteurs lysosomaux.

Conclusion générale

Dans l'ensemble, ce travail de thèse a contribué à mieux décrire les défauts morphologiques embryonnaires induits par la perte concomitante de la cystinosine et de PQLC2 chez la souris. Ces défauts ont vraisemblablement pour origine un défaut de la nutrition histiotrophique durant la neurulation. La défaillance de ce processus de nutrition se manifeste par un élargissement prononcé des compartiments endolysosomaux dans les cellules endodermales du sac vitellin, par un défaut de protéolyse dans ces cellules, et par une diminution des niveaux de nombreux acides aminés dans le fluide exocœlomique. Cette étude a aussi permis d'identifier des pistes suggérant un rôle possible de PQLC2 dans la microautophagie.

Nous avons pu obtenir un aperçu des altérations métaboliques induites par le double KO, et nous avons désormais une idée plus précise de quels processus biologiques pourraient être affectés. Cependant, l'identification de ces processus nécessitera la poursuite de ce travail et la collecte de données additionnelles, à l'aide des outils en cours d'implémentation au laboratoire.

L'exploration des implications biologiques de la cystinosine et de PQLC2 au-delà de leur rôle de transporteurs d'acides aminés va dans le sens du paradigme émergeant plaçant les protéines de la membrane du lysosome comme des acteurs de voies de signalisation cellulaire majeures, et constituera un enjeu important pour l'entière compréhension du spectre de défaillances cellulaires à l'œuvre dans la cystinose.

MATERIEL ET METHODES

Modèles cellulaires

a) Lignées de cellules utilisées

Les cellules utilisées sont des HAP1 (lignée immortalisée de cellules humaines quasiment haploïdes) achetées auprès du fournisseur Horizon Discovery. Nous avons acheté auprès d'eux les lignées KO pour CTNS (ref. HZGHC006455c005), KO pour PQLC2 (ref. HZGHC006457c002), KO pour C9orf72 (ref. HZGHC003729c002), double KO PQLC2/CTNS (ref. HZGHC006646c001) ainsi que les lignées parentales WT associées.

b) Culture cellulaire

Les cellules HAP1 sont cultivées dans du milieu de culture IMDM (Gibco ref. 12440-053) contenant 10% de sérum de veau fœtal (Gibco ref. 10500-064) et 1% d'un cocktail commercial de pénicilline-streptomycine (Gibco ref. 15070-63), à 37°C 5% CO_2, et repiquées deux fois par semaine. Pour l'utilisation en IF les cellules sont ensemencées sur des lamelles de verre recouvertes d'une matrice de collagène.

c) Carence nutritionnelle et traitements

La carence en acides aminés est effectuée en remplaçant le milieu de culture par de l'EBSS (Gibco ref. 24010-043) pré-équilibré à 37°C 5% CO_2 et supplémenté avec 1% de sérum dialysé (Gibco ref. 26400-035) afin de conserver des facteurs de croissance. Dans le cas d'un traitement pharmacologique, un volume de milieu de culture complet est préparé séparément et pré-équilibré en température et en CO_2 puis les cellules sont incubées dans ce milieu. Liste des sondes et agents pharmacologiques utilisées :

- ML-SA1 (Tocris ref. 4746)
- Torin 1 (Tocris ref. 4247)
- Dextran 10000 MW – AlexaFluor 568 (Thermo Fisher ref. D22912)
- Peroxyde d'hydrogène (Sigma Aldrich ref. 216763)
- Réactif de viabilité cellulaire Presto Blue (Life ref. A13261)

Les concentrations utilisées et durées de traitement sont précisées pour chaque expérience.

Modèles murins

a) Lignées

Les lignées murines utilisées sont les suivantes :

- Lignée *Ctns* KO sur fond C57BL/6J comme décrite dans (N. Nevo et al., 2010).
- Lignée *Pqlc2* KO sur fond C57BL/6N comme décrite dans la thèse de Xavier Leray.

- Lignée *Pqlc2/Ctns* (ou PC) sur fond mixte C57BL/6N – C57BL/6J issue du croisement des deux lignées précédentes.
- Lignée PC sur fond mixte C57BL/6N – C57BL/6J – B6D2

b) Gestion des lignées

Autorisation CEEA34.CAL.088.12 du comité d'éthique de l'Université Descartes.

A l'occasion de l'ouverture d'une nouvelle zone EOPS (exempt d'organisme pathogène spécifique) dans la plateforme d'hébergement et d'élevage du CUSP, Seana O'Regan et Christine Anne ont coordonné la redérivation de toutes nos lignées murines, ce qui m'a permis de travailler dès le début de ma thèse sur des lignées fraichement rétrocroisées.

Pour le maintien des lignées, les modalités de croisement étaient un mâle (entre deux mois et un an) accouplé avec deux femelles (entre deux mois et huit mois). Les accouplements entre animaux issus des portées d'une même cage (frère/sœur ou frère/demi-sœur) sont évités autant que possible. Dans chaque lignée, au minimum trois accouplements sont maintenus en permanence, en essayant de panacher les âges des femelles. Les modalités de croisement sont les suivantes :

- Les 'simple KO' (*Ctns* KO et *Pqlc2* KO) sont maintenus majoritairement à l'aide de croisements entre KO homozygotes, ceci afin de réduire le nombre d'animaux utilisés. Des croisements hétérozygotes ont été pratiqués soit lorsque des croisements KO homozygotes marchaient mal ou lorsque nous avions l'utilité d'un contrôle WT interne.

- La lignée PC a été maintenue à l'aide de croisements 'symétriques' (mâle et femelles du même génotype), donc subdivisée en deux catégories : les *Ctns* +/- *Pqlc2* -/- d'une part, et les *Ctns* -/- *Pqlc2* +/- d'autre part.

Ces lignées ne présentant pas de phénotype délétère susceptible d'impacter la qualité de vie des animaux, ils sont élevés dans des conditions d'élevage normales. Les animaliers de la zone EOPS ont rapporté une occurrence accrue de malocclusion dentaire et d'hydrocéphalie dans la lignée PC, symptômes généralement induits par la consanguinité. Ces différentes lignées se reproduisent normalement. L'obtention des données présentées dans cette thèse n'a pas nécessité le recours à des procédures invasives sur les animaux. Les conditions d'élevage sont une température de 23 °C et un changement de litière hebdomadaire.

c) Supplémentation nutritionnelle de l'eau de boisson

Un volume nécessaire de d'eau de boisson est préparé pour les animaux puis est supplémenté avec de l'arginine (5,5 g/L) ou de la N-acetylcystéine (2,4 g/L) aux concentrations indiquées. Pour éviter la dégradation des molécules et la pousse bactérienne, l'eau de boisson supplémentée est changée deux fois par semaine.

d) Supplémentation nutritionnelle des granulés

La composition détaillée des granulés supplémentés est disponible en annexe 8. Les animaux sont nourris avec les granulés pendant toute la durée de l'expérience. Le suivi de leur état de santé est assuré par les zootechniciens.

e) Phénotypage

Le choix des tests comportementaux et sensorimoteurs non invasifs effectués sur la souris DKO (#65_190612, cf. partie résultats) et les souris contrôle s'est appuyé sur le guide de phénotypage murin du Dr. J.N. Crawley *What's Wrong With My Mouse?: Behavioral Phenotyping of Transgenic and Knockout Mice, Second Edition* (DOI:10.1002/0470119055). La batterie de test SHIRPA, les tests Wire Hang, Open Field et Rotarod ont été sélectionnés.

L'analyse par IRM a été effectuée par la plateforme LIOPA d'Imagerie du Vivant et phénotypage du petit animal, à l'aide d'un Micro IRM 7 Tesla. La prise en charge des animaux et l'acquisition des données a été entièrement prise en charge par la plateforme.

Génotypage des animaux

Le génotypage des souriceaux ainsi que des embryons est effectué par PCR à partir d'échantillon de tissu. L'extraction d'ADN et la réaction de PCR sont effectuées à l'aide du kit Phire Animal Tissue Direct PCR (Thermo Fisher, ref. F140WH) en suivant les recommandations du fabriquant. Les protocoles utilisés pour chaque gène sont les suivants :

a) Ctns

- Antisens (amorce commune) : 5' CTTCCCATCCAGGGCAGC 3'
- Sens (mutant) : 5' TCCAGCGGGGGATCTCATGT 3'
- Sens (sauvage) : 5' GATCTTCGGAGACCCAAC 3'

	Température	Durée
Dénaturation initiale	98°C	5 min
40 cycles	98°C	10 sec
	58°C	15 sec
	72°C	30 sec
Elongation finale	72°C	1 min

b) <u>Pqlc2</u>

- Sens (amorce commune) : 5’ AAGCCTGTGAAACCCGAGAG 3’
- Antisens (mutant) : 5’ GACGACAGTATCGGCCTCAG 3’
- Antisens (sauvage) : 5’ TTAAGCTGCCCTACTGTGCC 3’

	Température	Durée
Dénaturation initiale	95°C	5 min
40 cycles	95°C	30 sec
	64°C	30 sec
	72°C	1 min
Elongation finale	72°C	5 min

Prélèvement d'échantillons embryonnaires

a) Extraction d'embryons

Afin de produire des embryons à un stade précis de développement, les souris sont utilisées dans des accouplements contrôlés. L'œstrus des femelles est contrôlé en fin de journée ; celles qui sont en œstrus sont placées dans la cage du mâle (ou éventuellement dans une cage neuve si l'encombrement de la cage est trop important) en fin de journée (19h environ). Elles sont ensuite isolées et pesées le lendemain entre 9h30 et 10h, et placées dans une nouvelle cage. Un suivi de poids à heure fixe est réalisé jusqu'au jour correspondant au stade embryonnaire souhaité. Si la souris n'est pas gravide elle est replacée dans sa cage d'origine ; si elle est gravide, elle est sortie et acheminée jusqu'au laboratoire, où elle est sacrifiée par élongation des cervicales dans une zone fermée et isolée.

Une incision est immédiatement pratiquée au niveau de l'abdomen et l'utérus gravide est extrait et placé dans une boite de pétri contenant du PBS à température ambiante. Si les embryons sont à stade égal ou supérieur à E10.5, les conceptus sont disséqués individuellement ; si le stade est inférieur à E10,5 l'utérus est disséqué en entier sans séparation des conceptus. Dans tous les cas, l'utérus et le sac vitellin pariétal sont retirés à l'aide de pinces fines.

b) Prélèvement de fluide exocœlomique

On prépare une seringue Hamilton propre de 50 µL et des tubes à vis pré-pesés. Les conceptus isolés comme décrit ci-dessus (dont le sac vitellin viscéral est encore intact) sont délicatement placés à sec dans une boite de pétri ; l'excédent de tampon est aspiré par capillarité avec un kimwipe. La seringue est utilisée de façon à ce que (1) aucun vaisseau sanguin visible ne soit percé et (2) l'angle employé soit très doux (environ 20 degrés par rapport à la boite de pétri) avec le biseau orienté vers le haut (i.e. le côté opposé à l'embryon), ceci afin de ne pas percer l'amnios et de ne récupérer que le fluide exocœlomique. Le prélèvement est ensuite placé dans un tube à vis, qui est promptement pesé puis immédiatement placé dans de l'azote liquide puis conservé à -80°C.

c) Prélèvement d'embryons ou de sacs vitellins

Les embryons sont isolés de leurs sacs vitellins à l'aide de pinces fines. Pour cela, le sac vitellin est sectionné progressivement au niveau de sa jonction avec la plaque chorionique, puis est séparé. Les embryons sont fixés dans du PFA à 4% dans du PBS pendant la nuit. Les sacs vitellins sont soit fixés de la même façon, soit maintenus *ex vivo* quelques heures (maximum quatre heures) en culture comme décrit ci-après. Après incubation sur la nuit dans le PFA à 4°C, les échantillons sont rincés au PBS puis conservés dans de l'éthanol à 70% à 4°C.

d) Maintien de sacs vitellins ex vivo et traitements aigus

Les sacs vitellins isolés sont rapidement placés dans du milieu DMEM (Gibco ref. 61965-026) contenant 10% (ou 1% si précisé) de sérum de veau fœtal (Gibco ref. 10500-064) et 1% d'un cocktail commercial de pénicilline-streptomycine (Gibco ref. 15070-63) pré-équilibré à 37°C 5% CO_2. Les milieux contiennent (ou non) une sonde fluorescente ou un agent pharmacologique comme précisé dans chaque expérience ; les sacs vitellins y sont maintenus pour une durée déterminée puis sont rincés avec du PBS et fixés. Après incubation sur la nuit dans le PFA à 4°C, les échantillons sont rincés au PBS puis conservés dans de l'éthanol à 70% à 4°C. Liste des sondes et agents pharmacologiques utilisées :

- Chlorohydrate de cystéamine (Sigma Aldrich ref. M6500)
- Transferrine humaine couplé à AlexaFluor 488 (Invitrogen ref. T1342)

Les concentrations utilisées et durées de traitement sont précisées pour chaque expérience.

Histologie et whole mount

a) Cryosections

Les échantillons biologiques (embryons ou sacs vitellins) fixés sont incubés dans une solution de sucrose à 30% w/v à 4°C pendant une nuit puis inclus dans du milieu de coupe OCT (VWR, ref. 00411243) et conservés temporairement à -20°C. Les échantillons inclus sont ensuite utilisés pour produire des sections de 5 µm d'épaisseur avec un cryostat Leica Reichert Jung Cryocut 1800 qui sont déposées sur des lames de verre Super Frost Plus (Thermo Fisher, ref.

J1800AMNZ) puis conservées temporairement à -20°C. Avant utilisation, l'OCT est retiré des coupes en les incubant 5 min dans du PBS sous agitation.

b) Paraffine

Les échantillons biologiques fixés ont été confiés à la plateforme d'histologie de l'Institut du Cerveau et de la Moelle épinière (ICM) à Paris qui ont réalisé l'inclusion en bloc de paraffine, ainsi qu'une partie des coupes. Une partie des coupes a été réalisée dans notre laboratoire avec un microtome DIS 2040. Les coupes de paraffine obtenues ont été déposées soit sur lames Super Frost Plus (Thermo Fisher, ref. J1800AMNZ) si coupes flottantes, soit sur lames Super Frost (Thermo Fisher, ref. AAAA000081) coatées avec de la gélatine-chrome (5 g/L gélatine + 0,5 g/L $CrK(SO_4)_2$), séchée 48h à température ambiante puis stockées à température ambiante. Avant utilisation, les coupes sont déparaffinées comme suit : 10 passages dans trois bains successifs de Xylène, puis réhydratation avec de l'éthanol 95%, puis 80%, puis 70% (30 sec par bain), puis 5 minutes dans de l'eau.

c) H&E

Sur cryosections ou sur sections déparaffinées : immersion dans de l'hématoxyline de Mayer (Sigma Aldrich, ref. MHS16) (filtrée avant utilisation) pendant 1 min 30 sec exactement, puis rinçage rapide et blueing à l'eau (courante) chaude pendant 10 min. Ensuite, 5 passages dans un bain d'éthanol 95%, puis immersion dans de l'éosine Y alcoolique (Sigma Aldrich, ref. HT110316) pendant 10 sec exactement. 10 lavages à l'eau, puis déshydratation avec de l'éthanol 95% puis deux bain avec de l'éthanol absolu (30 sec par bain). Laisser l'alcool

s'évaporer puis monter les coupes en milieu EUKIT (Dutscher ref. 045799), laisser prendre le milieu de montage over night.

d) Fluorescence au DAPI en whole mount

Les embryons fixés sont incubés sur la nuit à 4°C dans une solution contenant 10 µM DAPI + 0,5% Triton X-100 + 0,5% DMSO dans du PBS. Les embryons sont ensuite rincés 5 fois avec du PBS puis conservés dans du PBS à 4°C (2 jours maximum) jusqu'à acquisition au macroscope à fluorescence.

Immunofluorescence

a) IF sur tissus

Les sections à marquer sont entourées au feutre hydrophobe et rincées au PBS++ (PBS 1X contenant 100 µM de $MgCl_2$ et 100 µM de $CaCl_2$). Perméabilisation et saturation dans tu tampon IFT (BSA 0,2 % + Triton X-100 0,1 % dans PBS++) 20 min, incubation anticorps primaire(s) 30 min, 3 lavages de 5 min, incubation anticorps secondaire(s) (+ éventuellement DAPI 10 µM) 15 min, 3 lavages de 5 min, montage en Fluoromount G (Thermo Fisher ref. 00-4958-02), montage entre lame et lamelle, séchage sur la nuit. Conservation 4°C.

b) IF sur cellules

Si fixation au PFA : 10 minutes d'incubation avec du PFA 4% puis 15 minutes d'arrêt de la fixation avec NH_4Cl 50 mM ; si fixation au méthanol : 15 minutes d'incubation avec du méthanol pur (-20°C). 3 lavages de 5 min avec du PBS++, puis perméabilisation et saturation dans du tampon IFC (BSA 0,2 % + saponine 0,05 % dans PBS++) pendant 20 min, incubation anticorps primaire(s) 30 min, 3 lavages de 5 min, incubation anticorps secondaire(s) (+ éventuellement DAPI 10 µM) 15 min, 3 lavages de 5 min, montage en Fluoromount G (Thermo Fisher ref. 00-4958-02), montage entre lame et lamelle, séchage sur la nuit.

c) Anticorps utilisés

Cible	Fabriquant/référence	Espèce hôte	Clonalité	Dilution	Fixation
Albumine murine	abcam ab207327 [EPR20195]	Lapin	Monoclonal	1/500	PFA 4%
CALCOCO2/NDP52	Sigma HPA023195	Lapin	Polyclonal	1/100	Méthanol
Claudin-7	IBL # JP18875	Lapin	Polyclonal	1/200	PFA 4%
Ezrin	Cell Signaling #3145	Lapin	Polyclonal	1/200	PFA 4%
LAMP1 humain	DSHB H4A3	Souris	Monoclonal	1/300	PFA 4%
LAMP1 murin	DSHB 1D4B	Rat	Monoclonal	1/300	PFA 4%
LC3	Proteintech 14600-1-AP	Lapin	Polyclonal	1/100	PFA 4%
Megalin/LRP2	Thermo Fisher PA5-52234	Lapin	Monoclonal	1/100	PFA 4%
NDFIP1/NEDD4	Sigma HPA009682	Lapin	Polyclonal	1/50	Méthanol
p62/SQSTM1	Progen GP62C	Cochon d'Inde	Polyclonal	1/100	PFA 4%
SNX1	Santa Cruz sc-376376	Souris	Monoclonal	1/50	PFA 4%
TAX1BP1	Sigma HPA024432	Lapin	Polyclonal	1/50	Méthanol
Tubuline	Sigma T4026	Souris	Monoclonal	1/200	PFA 4%
Ubiquitine	ThermoFischer 13-1600	Souris	Monoclonal	1/100	PFA 4%

Microscopie et traitement d'image

a) Microscopie à épifluorescence

Les microscopes à épifluorescence utilisés au laboratoire sont un Nikon Eclipse TE2000-E utilisé avec un objectif 100x et un Zeiss Axio Observer Z1 utilisé avec un objectif 63x. Le Zeiss est utilisé uniquement pour les acquisitions sur cellules vivantes car il dispose d'une chambre permettant de maintenir la température à 37°C. Les piles d'images acquises au Nikon sont ouvertes sur ImageJ et déconvoluées à l'aide du plugin Iterative Deconvolve 3D et du point spread function (PSF) expérimental du microscope fourni par Isabelle Fanget.

b) Microscopie confocale

Le microscope confocal utilisé est le Zeiss LSM 880 (objectif 63x) du service commun de microscopie du CUSP ; durant cette thèse j'ai réalisé toutes les acquisitions avec le module Airyscan qui permet un gain de résolution d'un facteur 1,7. Les images sont traitées sur le logiciel Zeiss ZEN Black Edition v2.3. Lors d'une série d'acquisitions, les paramètres de puissance des lasers, du photomultiplicateur, d'ouverture du pinhole, de vitesse de scan et de résolution numérique sont ajustés pour ne pas saturer et sont maintenus constants.

c) Quantification

Les quantifications des images ont été réalisées à l'aide du logiciel IMARIS version 9.1.2, avec les fonctions Spot (segmentation pour la détermination du nombre de punctas), Cell (détection des noyaux pour compter les cellules) et Surface (détermination de la surface occupée par les lysosomes). La séquestration des punctas en deux populations 'proches' ou 'éloignées' des lysosomes a été réalisée à l'aide de la commande Matlab intégrée 'Find spots close to surface'.

d) Macroscopie à fluorescence

Nous avons utilisé le macroscope à fluorescence MacroFluo Leica Z6 APO de la plateforme d'imagerie du petit animal de l'université Descartes (LIOPA) pour imager des embryons au stade E10,5 colorés au DAPI (10 µM DAPI + 0,5% Triton X-100 + 0,5% DMSO dans du PBS sur la nuit à 4°C). Les piles d'images obtenues sont ouvertes sur ImageJ avec le plugin Bio Formats, puis l'image de l'embryon est reconstituée avec le plugin Stack Focuser (qui sélectionne automatiquement les zones au focus sur chaque plan).

e) Microscopie en lumière blanche

L'imagerie en lumière blanche des coupes histologiques colorées à l'H&E est effectuée à l'aide d'un scanner de lames Zeiss Axioscan Z1 (objectif 40x). Les images sont traitées sur le logiciel Zeiss ZEN Blue Edition v2.5.

f) Photographie en lumière blanche à la loupe binoculaire

Les images des embryons entiers en lumière blanche ont été réalisées avec un Canon EOS 80D fixé sur une des oculaires d'une loupe binoculaire Nikon SMZ655 à l'aide d'un adaptateur LMscope TUST30S.

Western Blot

a) Lyse des échantillons biologiques

Les échantillons biologiques (cellules ou tissus) sont lysés dans du tampon NP-40 (1% NP-40 + 150 mM NaCl + 5 mM EDTA + 50 mM Tris-HCl pH 8 + cocktail d'inhibiteurs de protéases Thermo Fisher ref. 1861279) et simultanément homogénéisés à la pipette de 200 µL pendant 5 minutes à 4°C. Les débris cellulaires restant sont éliminés après centrifugation et les lysats sont conservés à -20°C. La quantité de protéines totales est évaluée dans ces échantillons par BCA (voir ci-après).

Avant dépôt, les échantillons sont mélangés avec du tampon Laemmli 3X (tampon lithium dodecyl sulfate (LDS) commercial NuPage Thermo Fisher ref. NP0007 + 15% β-mercapto éthanol) et de l'eau de façon à obtenir une concentration en protéines identique d'un tube à l'autre.

b) Dosage des protéines totales par BiCinchoninic acid Assay (BCA)

Le dosage des divers échantillons biologiques est effectué à l'aide du kit BCA Protein Assay (Merck Millipore, ref. 71285-3) selon les recommandations du fabriquant (micro-scale assay). L'absorbance à 562 nm est mesurée sur plaque 96 puits à l'aide d'un lecteur de plaques EnSpire (Perkin Elmer) de la plateforme Cyto2BM du CUSP.

c) SDS-PAGE

Un gel de séparation est préparé afin d'obtenir une concentration finale de 10% acrylamide-bisacrylamide, 0,1% SDS, 370 mM Tris pH 8,8 (+ un gel de concentration). Le gel est fixé sur support et immergé dans un tampon Tris-Glycine-SDS commercial (Euromedex ref. EU0510-B). Les échantillons sont déposés à l'aide d'une seringue Hamilton et la migration se fait avec un ampérage imposé. Le gel est ensuite transféré sur membrane de nitrocellulose à voltage constant dans une cuve contenant un tampon Tris-Glycine-SDS, sur la nuit.

d) Western Blot

La membrane de nitrocellulose est rincée et l'efficacité du transfert est contrôlée à l'aide d'une coloration au rouge Ponceau. Les membranes sont ensuite bloquées pendant 1 heure minimum soit dans du PBS + 0,1% Tween-20 contenant soit 5% de lait ou 5% de BSA (Euromedex ref. 04-100-812-C), soit dans un tampon de blocage non protéique commercial (Pierce Protein-Free T20 Blocking Buffer, Thermo Fisher ref. 37571) selon l'anticorps utilisé. L'anticorps primaire est incubé pendant 3 à 4 heures à température ambiante ; le secondaire

est incubé pendant 1 heure. La révélation se fait avec un kit de luminol commercial (Lumi-Light Plus, Roche ref. 12015196001) pendant 5 min et l'acquisition est effectuée à l'aide de l'imageur ImageQuant LAS4000 de la plateforme Cyto2BM du CUSP.

e) Anticorps utilisés

Cible	Fabriquant/référence	Espèce hôte	Clonalité	Dilution	Taille attendue
Albumine murine	abcam ab207327 [EPR20195]	Lapin	Monoclonal	1/2000	69 kDa
CALCOCO2/NDP52	Sigma HPA023195	Lapin	Polyclonal	1/750	52 kDa
NDFIP1/NEDD4	Sigma HPA009682	Lapin	Polyclonal	1/125	25 kDa
p62/SQSTM1	Progen GP62C	Cochon d'Inde	Polyclonal	1/1000	62 kDa
TAX1BP1	Sigma HPA024432	Lapin	Polyclonal	1/250	92 kDa
β-actine humaine	Santa Cruz sc-47778	Souris	Monoclonal	1/500	45 kDa
β-actine murine	Cell Signaling #4970	Lapin	Monoclonal	1/1000	45 kDa

Analyse métabolomique des fluides exocœlomiques d'embryons E10,5

Les échantillons ont été collectés comme décrit dans la partie « Prélèvement d'échantillons embryonnaires ».

L'analyse du métabolome des liquides exocœlomiques a été effectuée par une approche LC-MS (Liquid Chromatography - Mass Spectrometry). Nos collaborateurs, les docteurs Florence Castelli et François Fenaille, nous ont transmis le protocole détaillé qu'ils ont utilisé pour produire ces données et faire l'analyse statistique. Ce protocole est disponible dans la partie « Protocole complémentaire détaillé de l'analyse métabolomique ».

Transport d'arginine sur lysosomes partiellement purifiés

Des souris de génotype donné sont mises à jeun la veille de l'expérience, puis sacrifiées par dislocation des cervicales, les foies sont immédiatement extraits, pesés et homogénéisés dans un potter contenant un tampon sucrose 250 mM. L'ensemble du protocole de purification se fait à 4°C. Après plusieurs centrifugations à 1000 g (10 min) et ultracentrifugations à 8000 rpm (8 min) puis 25000 rpm (8 min) le culot enrichi en lysosomes est repris soit dans du tampon sucrose 250 mM soit dans un autre tampon si précisé.

L'intégrité des lysosomes (latence) est évaluée en dosant l'activité de la β-galactosidase* dans la fraction enrichie en lysosomes en comparant une condition où la fraction est préservée et une condition ou les endomembranes sont détruites par un détergeant (Triton X-100). L'activité β-galactosidase en conditions de lyse permet d'évaluer 'l'activité lysosomale' totale de la préparation ; l'activité β-galactosidase sans lyse correspond à l'enzyme libérée par les lysosomes détruits durant le processus de purification ; la différence entre les deux permet d'évaluer la quantité de lysosomes dont les membranes ne sont pas perméabilisées. A noter, ces activités enzymatiques sont normalisées par rapport à la quantité de protéines totales évaluées par BCA (protocole détaillé du BCA dans la partie Western Blot).

On utilise alors cette mesure pour utiliser dans chaque condition (génotype, tampon etc.) la même quantité de lysosomes intacts. Ces lysosomes sont conservés sur glace jusqu'à utilisation. Pour chaque point de temps dans chaque condition on effectue 3 réplicats expérimentaux + 2 réplicats pré-traités à la chloroquine afin d'évaluer le signal lysosomal (cf. figure 18). L'incubation est démarrée par ajout d'un mélange d'arginine radiomarquée (^{3}H) et

d'arginine froide (à un ratio connu) et ajusté pour atteindre une concentration finale de 350 µM dans le tube, lequel est ensuite homogénéisé brièvement puis incubé à 25°C pour un temps donné (NB : si un agent pharmacologique est testé, il est pré-incubé avec les lysosomes avant l'ajout de substrat radiomarqué). L'arrêt de l'incubation se fait par ajout de PBS glacial puis filtration sur membrane de nitrocellulose. Les membranes sont dissoutes dans du liquide à scintillation, homogénéisées et les résultats sont obtenus ensuite à l'aide d'un compteur à scintillation. Les résultats en désintégrations par minutes (dpm) sont convertis en pmoles d'arginine à partir de l'activité spécifique de la solution utilisée.

**Mesure de l'activité β-galactosidase*

Des échantillons des préparations de lysosomes sont incubées en présence de Méthylumbelliferyl-galactoside (substrat de l'enzyme générant un produit fluorescent) à 500 µM final dans un tampon acétate 50 mM pH 5,0 + NaCl 50 mM pendant exactement 10 minutes à 37°C. La réaction est arrêtée par ajout d'une solution de fixateur (0,5 M glycine, 0,5 M Na_2CO_3 ajusté à pH 10,5 avec NaOH + Triton X100 10%) à 4°C. La fluorescence est ensuite lue à l'aide d'un lecteur de plaques EnSpire (Perkin Elmer) de la plateforme Cyto2BM du CUSP, avec λex = 365 nm et λem = 450 nm.

Protocole complémentaire détaillé de l'analyse métabolomique

a) Raw experimental data acquition

Chemicals and reagents

All analytical grade reference compounds were from Sigma (Saint Quentin Fallavier, France). The standard mixtures used for the external calibration of the MS instrument (Calmix-positive, for the positive ion mode, consisting of caffeine, L-methionyl-arginyl-phenylalanyl-alanine acetate, and Ultramark 1621, and Calmix-negative, for the negative ion mode, consisting of same mixture plus sodium dodecyl sulfate and sodium taurocholate) were from Thermo Fisher Scientific (Courtaboeuf, France). Acetonitrile (ACN) was from SDS (Peypin, France), formic acid from Merck (Briare-le-Canal, France), methanol from VWR Chemicals (Fontenay-sous-Bois, France) and deionized water from Biosolve chemicals (Dieuse, France).

Metabolite extraction

After thawing at room temperature, samples were immediately processed. Ultrapure water was added QSP 50µL to each samples. The 50 µL were deproteinized in microcentrifuge tubes by adding 200 µL of methanol, thoroughly vortexed, incubated in an ultrasonic bath for 5 minutes and then left on ice for 90 minutes until complete proteins precipitation. After centrifugation at 20000 g for 15 minutes at 4°C, supernatants were dried under a stream of nitrogen using a TurboVap instrument (Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France) and stored at −80 °C until analysis. The solubilization volumes of the dried extracts were calculated and normalized at 4µg of total protein /10µL (volume of injection) and then transferred to 0.2 mL vials. Internal standard solution (5 µL; mixture of 9 authentic chemical standards covering

the mass range of interest: 13C-glucose, 15N-aspartate, ethylmalonic acid, amiloride, prednisone, metformin, atropine sulfate, colchicine, imipramine) was added to all samples in order to check for consistency of analytical results in terms of signal and retention time stability throughout the experiment. In addition, a quality control (QC) sample was obtained by pooling 20 µL of each sample preparation. It was injected every 5 samples in order to evaluate the analytical error for each metabolite.

Liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry

The ultra-high performance liquid chromatographic (UHPLC) separation was performed on a Hypersil GOLD C8 1.9 µm, 2.1 mm x 150 mm column (RP) at 30°C (Thermo Fisher Scientific, les Ulis, France), and HPLC chromatographic separations were performed on a Sequant ZICpHILIC 5 µm, 2.1 x 150 mm (HILIC) at 15°C (Merck, Darmstadt, Germany). All chromatographic systems were equipped with an on-line prefilter (Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France). Experimental settings for each LC/MS condition are described below. Mobile phases for RP columns were 100% water in A and 100% ACN in B, both containing 0.1% formic acid. Regarding HILIC, phase A consisted of an aqueous buffer of 10 mM ammonium carbonate in water adjusted to pH 10.5 with ammonium hydroxide, whereas pure ACN was used as solvent B. Chromatographic elutions were achieved under gradient conditions as follows: (i) RP-based system: the flow rate was set at 500 µL/min. The elution consisted of an isocratic step of 2 minutes at 5% phase B, followed by a linear gradient from 5 to 100% of phase B for the next 11 minutes. These proportions were kept constant for 12.5 min before returning to 5% B for 4.5 min. (ii) HILIC-based system: the flow rate was 200 µL/min. Elution started with an isocratic step of 2 min at 80% B, followed by a linear gradient from 80 to 40% of phase B from 2 to 12 min. The chromatographic system was then rinsed for 5 min at 0% B, and the run ended with

an equilibration step of 15 min (80% B). LC-MS analyses were performed using a U3000 liquid chromatography system coupled to an Exactive mass spectrometer from Thermo Fisher Scientific (Courtaboeuf, France) fitted with an electrospray source operated in the positive and negative ion modes. The software interface was Xcalibur (version 2.1) (Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France). The mass spectrometer was calibrated before each analysis in both ESI polarities using the manufacturer's predefined methods and recommended calibration mixture provided by the manufacturer (external calibration). The Exactive mass spectrometer was operated with capillary voltage at -3 kV in the negative ionization mode and 5 kV in the positive ionization mode and a capillary temperature set at 280°C. The sheath gas pressure and the auxiliary gas pressure were set, respectively, at 60 and 10 arbitrary units with nitrogen gas. The mass resolution power of the analyzer was 50,000 m/?m, full width at half maximum (FWHM) at m/z 200, for singly charged ions. The detection was achieved from m/z 85 to 1000 for RP conditions in the positive ionization mode and from m/z 50 to 1000 for HILIC conditions in the negative ionization mode.

b) Data treatment

Processing

All raw data were manually inspected using the Qualbrowser module of Xcalibur version 2.1 (Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France). Raw files were first of all converted to mzXML format using MSConvert software. Automatic peak detection and integration were performed using the XCMS software package (W4M platform, ref: F. Giacomoni et al. bioinformatics, 2014), which returned a data matrix containing m/z and retention time values of features

together with their concentrations expressed in arbitrary units (i.e., areas of chromatographic peaks). XCMS features were thereafter filtered according to the following criteria: (i) the correlation between dilution factors of QC samples and areas of chromatographic peaks (filtered variables should exhibit coefficients of correlation above 0.7 in order to account for metabolites occurring at low concentrations and which are not detected anymore in the most diluted samples), (ii) repeatability (the coefficient of variations obtained for chromatographic peak areas of QC samples should be below 30%) and (iii) ratio of chromatographic peak area of biological to blank samples above a value of 3. Optionally, if necessary, chromatographic peak areas of each variable present in the XCMS peak lists were normalized using the LOESS algorithm in order to remove analytical drift induced by clogging of the ESI source observed in the course of analytical runs.

Annotation

Features were annotated by matching their accurate measured masses ± 10 ppm with theoretical masses contained in biochemical and metabolomic databases by using an informatics tool developed in R language. The databases used were the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) (Kanehisa M, Goto S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. Nucleic Acids Res 2000 Jan 1;28(1):27-30), the Human Metabolome Database (HMDB) (Wishart DS, Tzur D, Knox C, Eisner R, Guo AC, Young N, et al. HMDB: the Human Metabolome Database. Nucleic Acids Res 2007 Jan;35(Database issue):D521-D526) and METLIN (Smith CA, O'Maille G, Want EJ, Qin C, Trauger SA, Brandon TR, et al. METLIN: a metabolite mass spectral database. Ther Drug Monit 2005 Dec;27(6):747-751). Features were also annotated by our spectral database according to accurately measured masses and chromatographic retention times (Boudah S, Olivier MF, ros-Calt S, Oliveira L, Fenaille F, Tabet

JC, et al. Annotation of the human serum metabolome by coupling three liquid chromatography methods to high-resolution mass spectrometry. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 2014 Sep 1;966:34-47). To be identified, ions had to match at least 2 orthogonal criteria (accurately measured mass, isotopic pattern, MS/MS spectrum and retention time) to those of an authentic chemical standard analyzed under the same analytical conditions, as proposed by the Metabolomics Standards Initiative (Sumner LW, Amberg A, Barrett D, Beale MH, Beger R, Daykin CA, et al. Proposed minimum reporting standards for chemical analysis. Metabolomics 2007 Sep;3(3):211-221).

KHM annotation

This annotation is done using public data bases (KEGG, METLIN and HMDB), faciliting the annotation of unknown metabolites. However, it is not currently and is only based on mz.

SPI annotation

This annotation is done using SPI intern data bases and is based on comparison of mz and retention time from experimental data to referent molecules from SPI chimiotech. Compared to annotation by public databases, this system takes into account the fact that mz are not necessarily pseudomolecular ions, but can be isotopes, adducts or fragments. It also takes into account the different chromatographic systems used in the laboratory for retention times (HILIC, C18).

Statistical analysis

Chromatographic peak areas contained in the filtered and processed XCMS data matrices were statistically analyzed using both multivariate (PCA, PLS-DA) and univariate statistical technique in order to identify pertinent metabolites.

Univariate analysis

Univariate statistical analysis was used to reduce the number of measured analytes to only those showing significative changes between different conditions. We have studied each variable (ie metabolites) separetly to find which ones vary significantly between groups of samples.

Basically, univariate statistical test follows the same priniple, which consists in stating a null hypothesis (H0) and a risk of error α (probability of wrongly rejecting the null hypothesis H0)) which is usually 0.05. The null hypothesis here is that the compared groups of samples are identical. If the p-value is lower than α, difference between the two populations is unlikely to have occurred by chance, i.e. is statistically significant.

Parametric and non-parametric test

Classical parametric and non-parametric univariate tests were used to analyze data. Following a decision tree, test was choosen according to number of levels per group and nature of data (quantitative or qualitatif). Parametric test assume some hypothesis on data whereas non-parametric doesn't need any requirement but may lacks of power.

Two-level factor:

Parametric : Student test (t-test) this test is based on comparing mean of samples group, null hypothesis H0 being µg1=µg2

Non-parametric : Mann-Witney/Wilcoxon test (U-test) : This test is the "non-parametric" alternative to t-test. It focuses on ranks of the values.

More than two-level factor:

Parametric : Analysis of variance (ANOVA) : This test is a generalization of t-test to more than 2 groups, null hypothesis H0 being μg1=μg2=μgi

Non-parametric : Kruskal-Wallis : This test is a generalization of U-test to more than 2 groups.

In case of more than two-level factor, when the null hypothesis of equality of mean was rejected, we have performed “post-hoc” tests to specify which group differ from the other. These tests must take into account the increased risk of finding a difference wrongly, due to multiple comparisons.

Multiple test correction

In untargeted metabolomics studies the number of univariate test performed is equal to the number of metabolites detected. Therefor, as the number of test performed increases, the probabilty of wrongly rejecting a null hypothesis because of random chance might occur and correction for multiple testing need to be performed.Here, p-values were adjusted with Benjamini–Hochberg method.

Global adjusted p-values, and the corresponding decisions according to the selected threshold are provided as outputs. However, univariate methods sometimes fail to discriminate between groups if there are only minor differences on single metabolite level. Therefor, multivariate analysis is also required.

Multivariate analysis

Multivariate approaches model the relationships between metabolites and/or samples to detect group differences. The most prominent multivariate analysis techniques applied in the field of metabolomics are principal component analysis (PCA) and partial least squares regression discriminant analysis (PLS-DA).

PCA

We first start a preliminary investigation with PCA analysis. Principal component analysis is a dimensionality reduction technique. It represent data in a lower dimensional space identifying a smaller number of decorrelated principal components in order to identify the largest sources of variation. PCA is an unsupervised method as it use no information about the sample class. Data was center and scaled before applying PCA.

PLS-DA

PLS regression, which belongs to the class of supervised linear mixture models, attempts to find an optimal decomposition of the datamatrix (containing multivariate metabolite data) given a response vector Y. In discriminant analysis, Y indicates the class membership of each sample. Therefore, PLS-DA is a supervised method as it uses information about sample class.

Results include the R2 and Q2 quality metrics (Eriksson et al. 2001, Tenenhaus (1998)), the permutation diagnostics (Szymanska et al. 2012), the computation of the VIP values (Wold, Sjostrom, and Eriksson 2001) computed thanks to the ropls package. Calculation of PC is done using NIPALS algorithm as it can handle missing data.

In both PCA and PLS-DA, ellipses were drawn assuming a multivariate t-distribution with a confidence level of 0.95.

REFERENCES

Abu-Remaileh, M., Wyant, G. A., Kim, C., Laqtom, N. N., Abbasi, M., Chan, S. H., … Sabatini, D. M. (2017). Lysosomal metabolomics reveals V-ATPase- and mTOR-dependent regulation of amino acid efflux from lysosomes. *Science*, *358*(6364), 807–813. https://doi.org/10.1126/science.aan6298

Aits, S., & Jaattela, M. (2013). Lysosomal cell death at a glance. *Journal of Cell Science*, *126*(9), 1905–1912. https://doi.org/10.1242/jcs.091181

Al-Sarraj, S., King, A., Troakes, C., Smith, B., Maekawa, S., Bodi, I., … Shaw, C. E. (2011). p62 positive, TDP-43 negative, neuronal cytoplasmic and intranuclear inclusions in the cerebellum and hippocampus define the pathology of C9orf72-linked FTLD and MND/ALS. *Acta Neuropathologica*, *122*(6), 691–702. https://doi.org/10.1007/s00401-011-0911-2

Albers, E. (2009, December). Metabolic characteristics and importance of the universal methionine salvage pathway recycling methionine from 5'-methylthioadenosine. *IUBMB Life*, Vol. 61, pp. 1132–1142. https://doi.org/10.1002/iub.278

Albrecht, L. V., Bui, M. H., & De Robertis, E. M. (2019). Canonical Wnt is inhibited by targeting one-carbon metabolism through methotrexate or methionine deprivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *116*(8), 2987–2995. https://doi.org/10.1073/pnas.1820161116

Albrecht, L. V., Ploper, D., Tejeda-Muñoz, N., & De Robertis, E. M. (2018). Arginine methylation is required for canonical Wnt signaling and endolysosomal trafficking. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *115*(23), E5317–E5325. https://doi.org/10.1073/pnas.1804091115

Allison, R., Lumb, J. H., Fassier, C., Connell, J. W., Martin, D. Ten, Seaman, M. N. J., … Reid, E. (2013). An ESCRT-spastin interaction promotes fission of recycling tubules from the endosome. *Journal of Cell Biology*, *202*(3), 527–543. https://doi.org/10.1083/jcb.201211045

Amick, J., Roczniak-Ferguson, A., & Ferguson, S. M. (2016). C9orf72 binds SMCR8, localizes to lysosomes, and regulates mTORC1 signaling. *Molecular Biology of the Cell*, *27*(20), 3040–3051. https://doi.org/10.1091/mbc.e16-01-0003

Amick, Joseph, Tharkeshwar, A. K., Amaya, C., & Ferguson, S. M. (2018). WDR41 supports lysosomal response to changes in amino acid availability. *Molecular Biology of the Cell*, *29*(18), 2213–2227. https://doi.org/10.1091/mbc.e17-12-0703

Amick, Joseph, Tharkeshwar, A. K., Talaia, G., & Ferguson, S. M. (2020). PQLC2 recruits the C9orf72 complex to lysosomes in response to cationic amino acid starvation. *The Journal of Cell Biology*, *219*(1). https://doi.org/10.1083/jcb.201906076

Amsellem, S., Gburek, J., Hamard, G., Nielsen, R., Willnow, T. E., Devuyst, O., … Kozyraki, R. (2010). Cubilin is essential for albumin reabsorption in the renal proximal tubule. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, *21*(11), 1859–1867. https://doi.org/10.1681/ASN.2010050492

Andrzejewska, Z., Nevo, N., Thomas, L., Chhuon, C., Bailleux, A., Chauvet, V., … Antignac, C. (2016). Cystinosin is a component of the vacuolar H+-ATPase-ragulator-rag complex controlling mammalian target of rapamycin complex 1 signaling. *Journal of the American Society of*

Nephrology, *27*(6), 1678–1688. https://doi.org/10.1681/ASN.2014090937

Bacchetta, J., Greco, M., Bertholet-Thomas, A., Nobili, F., Zustin, J., Cochat, P., … Boivin, G. (2016). Skeletal implications and management of cystinosis: three case reports and literature review. *BoneKEy Reports*, *5*, 828. https://doi.org/10.1038/bonekey.2016.55

Ballabio, A., & Bonifacino, J. S. (2019, February 1). Lysosomes as dynamic regulators of cell and organismal homeostasis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. https://doi.org/10.1038/s41580-019-0185-4

Bandyopadhyay, U., Kaushik, S., Varticovski, L., & Cuervo, A. M. (2008). The Chaperone-Mediated Autophagy Receptor Organizes in Dynamic Protein Complexes at the Lysosomal Membrane. *Molecular and Cellular Biology*, *28*(18), 5747–5763. https://doi.org/10.1128/mcb.02070-07

Baum, M. (1998). The Fanconi syndrome of cystinosis: insights into the pathophysiology. *Pediatric Nephrology*, *12*(6), 492–497. https://doi.org/10.1007/s004670050495

Beck, F., Lloyd, J. B., & Griffiths, A. (1967). Lysosomal Enzyme Inhibition by Trypan Blue: A Theory of Teratogenesis. *Science*, *157*(3793), 1180–1182. https://doi.org/10.1126/science.157.3793.1180

Beck, F., Swidzinska, P., & Gulamhusein, A. (1978). The effect of trypan blue on the development of the ferret and rat. *Teratology*, *18*(2), 187–191. https://doi.org/10.1002/tera.1420180203

Bissig, C., Hurbain, I., Raposo, G., & van Niel, G. (2017). PIKfyve activity regulates reformation of terminal storage lysosomes from endolysosomes. *Traffic*, *18*(11), 747–757. https://doi.org/10.1111/tra.12525

Bizzarri, M., Fuso, A., Dinicola, S., Cucina, A., & Bevilacqua, A. (2016, October 2). Pharmacodynamics and pharmacokinetics of inositol(s) in health and disease. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*, Vol. 12, pp. 1181–1196. https://doi.org/10.1080/17425255.2016.1206887

Bjørkøy, G., Lamark, T., Brech, A., Outzen, H., Perander, M., Øvervatn, A., … Johansen, T. (2005). p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *The Journal of Cell Biology*, *171*(4), 603–614. https://doi.org/10.1083/jcb.200507002

Bright, N. A., Davis, L. J., & Luzio, J. P. (2016). Endolysosomes Are the Principal Intracellular Sites of Acid Hydrolase Activity. *Current Biology*, *26*(17), 2233–2245. https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.06.046

Brosnan, J. T. (2000). Glutamate, at the Interface between Amino Acid and Carbohydrate Metabolism. *The Journal of Nutrition*, *130*(4), 988S-990S. https://doi.org/10.1093/jn/130.4.988s

Brosnan, M. E., & Brosnan, J. T. (2007). Orotic acid excretion and arginine metabolism. *The Journal of Nutrition*, *137*(6 Suppl 2), 1656S-1661S. https://doi.org/10.1093/jn/137.6.1656S

Burton, G. J., Hempstock, J., & Jauniaux, E. (2001). NUTRITION, GENETICS AND PLACENTAL DEVELOPMENT Nutrition of the Human Fetus during the First Trimester—A Review. *Placenta*, *22*(15), 70–76. https://doi.org/10.1053/plac.2001.0639

Calcraft, P. J., Ruas, M., Pan, Z., Cheng, X., Arredouani, A., Hao, X., … Zhu, M. X. (2009). NAADP mobilizes calcium from acidic organelles through two-pore channels. *Nature*, *459*(7246), 596–600. https://doi.org/10.1038/nature08030

Cang, C., Aranda, K., Seo, Y. J., Gasnier, B., & Ren, D. (2015). TMEM175 Is an Organelle K^+ Channel

Regulating Lysosomal Function. *Cell*, *162*(5), 1101–1112. https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.08.002

Cang, C., Bekele, B., & Ren, D. (2014). The voltage-gated sodium channel TPC1 confers endolysosomal excitability. *Nature Chemical Biology*, *10*(6), 463–469. https://doi.org/10.1038/nchembio.1522

Cang, C., Zhou, Y., Navarro, B., Seo, Y. J., Aranda, K., Shi, L., … Ren, D. (2013). MTOR regulates lysosomal ATP-sensitive two-pore Na+ channels to adapt to metabolic state. *Cell*, *152*(4), 778–790. https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.01.023

Cao, Q., Yang, Y., Zhong, X. Z., & Dong, X. P. (2017). The lysosomal Ca2+ release channel TRPML1 regulates lysosome size by activating calmodulin. *Journal of Biological Chemistry*, *292*(20), 8424–8435. https://doi.org/10.1074/jbc.M116.772160

Cases, O., Joseph, A., Obry, A., Santin, M. D., Ben-Yacoub, S., Pâques, M., … Kozyraki, R. (2015). Foxg1-Cre Mediated Lrp2 Inactivation in the Developing Mouse Neural Retina, Ciliary and Retinal Pigment Epithelia Models Congenital High Myopia. *PLOS ONE*, *10*(6), e0129518. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129518

Cases, O., Obry, A., Ben-Yacoub, S., Augustin, S., Joseph, A., Toutirais, G., … Kozyraki, R. (2017). Impaired vitreous composition and retinal pigment epithelium function in the FoxG1::LRP2 myopic mice. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, *1863*(6), 1242–1254. https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.03.022

Castellano, B. M., Thelen, A. M., Moldavski, O., Feltes, M., Van Der Welle, R. E. N., Mydock-McGrane, L., … Zoncu, R. (2017). Lysosomal cholesterol activates mTORC1 via an SLC38A9-Niemann-Pick C1 signaling complex. *Science*, *355*(6331), 1306–1311. https://doi.org/10.1126/science.aag1417

Chapel, A., Kieffer-Jaquinod, S., Sagné, C., Verdon, Q., Ivaldi, C., Mellal, M., … Journet, A. (2013). An Extended Proteome Map of the Lysosomal Membrane Reveals Novel Potential Transporters. *Molecular & Cellular Proteomics*, *12*(6), 1572–1588. https://doi.org/10.1074/mcp.M112.021980

Chen, W. S., Manova, K., Weinstein, D. C., Duncan, S. A., Plump, A. S., Prezioso, V. R., … Darnell, J. E. (1994). Disruption of the HNF-4 gene, expressed in visceral endoderm, leads to cell death in embryonic ectoderm and impaired gastrulation of mouse embryos. *Genes & Development*, *8*(20), 2466–2477. https://doi.org/10.1101/gad.8.20.2466

Chen, Y., Gucek, M., Puertollano, R., & Martina, J. a. (2012). MTORC1 functions as a transcriptional regulator of autophagy by preventing nuclear transport of TFEB. *Autophagy*, *8*(6), 877–876. https://doi.org/10.4161/auto.19653

Cherqui, Stephanie. (2012, January 2). Cysteamine therapy: A treatment for cystinosis, not a cure. *Kidney International*, Vol. 81, pp. 127–129. https://doi.org/10.1038/ki.2011.301

Cherqui, Stephanie, & Courtoy, P. J. (2017, February 1). The renal Fanconi syndrome in cystinosis: Pathogenic insights and therapeutic perspectives. *Nature Reviews Nephrology*, Vol. 13, pp. 115–131. https://doi.org/10.1038/nrneph.2016.182

Cherqui, Stéphanie, Sevin, C., Hamard, G., Kalatzis, V., Sich, M., Pequignot, M. O., … Antignac, C. (2002). Intralysosomal cystine accumulation in mice lacking cystinosin, the protein defective in cystinosis. *Molecular and Cellular Biology*, *22*(21), 7622–7632. https://doi.org/10.1128/MCB.22.21.7622-7632.2002

Chevronnay, H. P. G., Janssens, V., Smissen, P. Van Der, Kuli, F. N., Nevo, N., Guiot, Y., … Courtoy, P. J. (2014). *Time Course of Pathogenic and Adaptation Mechanisms in Cystinotic Mouse Kidneys*.

1256–1269. https://doi.org/10.1681/ASN.2013060598

Chol, M., Nevo, N., Cherqui, S., Antignac, C., & Rustin, P. (2004). Glutathione precursors replenish decreased glutathione pool in cystinotic cell lines. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *324*(1), 231–235. https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2004.09.033

Choy, C. H., Han, B. K., & Botelho, R. J. (2017). Phosphoinositide Diversity, Distribution, and Effector Function: Stepping Out of the Box. *BioEssays*, *39*(12), 1–11. https://doi.org/10.1002/bies.201700121

Christ, A., Christa, A., Kur, E., Lioubinski, O., Bachmann, S., Willnow, T. E., & Hammes, A. (2012). LRP2 Is an Auxiliary SHH Receptor Required to Condition the Forebrain Ventral Midline for Inductive Signals. *Developmental Cell*, *22*(2), 268–278. https://doi.org/10.1016/J.DEVCEL.2011.11.023

Cindrova-Davies, T., Jauniaux, E., Elliot, M. G., Gong, S., Burton, G. J., & Charnock-Jones, D. S. (2017). RNA-seq reveals conservation of function among the yolk sacs of human, mouse, and chicken. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *114*(24), E4753–E4761. https://doi.org/10.1073/pnas.1702560114

Colas, J.-F., & Schoenwolf, G. C. (2001). Towards a cellular and molecular understanding of neurulation. *Developmental Dynamics*, *221*(2), 117–145. https://doi.org/10.1002/dvdy.1144

Copp, A. J., & Greene, N. D. E. (2013). Neural tube defects – disorders of neurulation and related embryonic processes. *Wiley Interdisciplinary Reviews. Developmental Biology*, *2*(2), 213. https://doi.org/10.1002/WDEV.71

De Las Heras, J., Aldámiz-Echevarría, L., Martínez-Chantar, M. L., & Delgado, T. C. (2017, April 3). An update on the use of benzoate, phenylacetate and phenylbutyrate ammonia scavengers for interrogating and modifying liver nitrogen metabolism and its implications in urea cycle disorders and liver disease. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*, Vol. 13, pp. 439–448. https://doi.org/10.1080/17425255.2017.1262843

DeJesus-Hernandez, M., Mackenzie, I. R., Boeve, B. F., Boxer, A. L., Baker, M., Rutherford, N. J., … Rademakers, R. (2011). Expanded GGGGCC Hexanucleotide Repeat in Noncoding Region of C9ORF72 Causes Chromosome 9p-Linked FTD and ALS. *Neuron*, *72*(2), 245–256. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.09.011

Dickson, L. E., Wagner, M. C., Sandoval, R. M., & Molitoris, B. A. (2014). The proximal tubule and albuminuria: Really! *Journal of the American Society of Nephrology*, *25*(3), 443–453. https://doi.org/10.1681/ASN.2013090950

Doubravska, L., Krausova, M., Gradl, D., Vojtechova, M., Tumova, L., Lukas, J., … Korinek, V. (2011). Fatty acid modification of Wnt1 and Wnt3a at serine is prerequisite for lipidation at cysteine and is essential for Wnt signalling. *Cellular Signalling*, *23*(5), 837–848. https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2011.01.007

Duncan, S. A., Manova, K., Chen, W. S., Hoodless, P., Weinstein, D. C., Bachvarova, R. F., & Darnell, J. E. (1994). Expression of transcription factor HNF-4 in the extraembryonic endoderm, gut, and nephrogenic tissue of the developing mouse embryo: HNF-4 is a marker for primary endoderm in the implanting blastocyst. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *91*(16), 7598–7602. https://doi.org/10.1073/pnas.91.16.7598

Echelard, Y., Epstein, D. J., St-Jacques, B., Shen, L., Mohler, J., McMahon, J. A., & McMahon, A. P. (1993). Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell*, *75*(7), 1417–1430. https://doi.org/10.1016/0092-

8674(93)90627-3

Emma, F., Nesterova, G., Langman, C., Labbé, A., Cherqui, S., Goodyer, P., … Levtchenko, E. (2014). Nephropathic cystinosis: An international consensus document. *Nephrology Dialysis Transplantation*, Vol. 29, pp. iv87–iv94. https://doi.org/10.1093/ndt/gfu090

Epple, U. D., Suriapranata, I., Eskelinen, E.-L., & Thumm, M. (2001). Aut5/Cvt17p, a Putative Lipase Essential for Disintegration of Autophagic Bodies inside the Vacuole. *Journal of Bacteriology*, *183*(20), 5942–5955. https://doi.org/10.1128/JB.183.20.5942-5955.2001

Eskelinen, E. L., Illert, A. L., Tanaka, Y., Schwarzmann, G., Blanz, J., Von Figura, K., & Saftig, P. (2002). Role of LAMP-2 in lysosome biogenesis and autophagy. *Molecular Biology of the Cell*, *13*(9), 3355–3368. https://doi.org/10.1091/mbc.E02-02-0114

Farré, J. C., Krick, R., Subramani, S., & Thumm, M. (2009, August). Turnover of organelles by autophagy in yeast. *Current Opinion in Cell Biology*, Vol. 21, pp. 522–530. https://doi.org/10.1016/j.ceb.2009.04.015

Festa, B. P., Chen, Z., Berquez, M., Debaix, H., Tokonami, N., Prange, J. A., … Luciani, A. (2018). Impaired autophagy bridges lysosomal storage disease and epithelial dysfunction in the kidney. *Nature Communications*, *9*(1). https://doi.org/10.1038/s41467-017-02536-7

Fisher, C. E., & Howie, S. E. M. (2006). The role of megalin (LRP-2/Gp330) during development. *Developmental Biology*, *296*(2), 279–297. https://doi.org/10.1016/J.YDBIO.2006.06.007

Freeman, S. J., Beck, F., & Lloyd, J. B. (1981). The role of the visceral yolk sac in mediating protein utilization by rat embryos cultured in vitro. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, *66*, 223–234. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6175716

Freeman, S. J., & Lloyd, J. B. (1983). Inhibition of proteolysis in rat yolk sac as a cause of teratogenesis. Effects of leupeptin in vitro and in vivo. *J Embryol Exp Morphol*, *78*, 183–193. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6663224

Fujimura, N. (2016, November 30). WNT/β-catenin signaling in vertebrate eye development. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, Vol. 4. https://doi.org/10.3389/fcell.2016.00138

Gahl, W. A., Kuehl, E. M., Iwata, F., Lindblad, A., & Kaiser-Kupfer, M. I. (2000). Corneal Crystals in Nephropathic Cystinosis: Natural History and Treatment with Cysteamine Eyedrops. *Molecular Genetics and Metabolism*, *71*(1–2), 100–120. https://doi.org/10.1006/mgme.2000.3062

Gailus, S., Höhne, W., Gasnier, B., Nürnberg, P., Fowler, B., & Rutsch, F. (2010, May). Insights into lysosomal cobalamin trafficking: Lessons learned from cblF disease. *Journal of Molecular Medicine*, Vol. 88, pp. 459–466. https://doi.org/10.1007/s00109-010-0601-x

Galarreta, C. I., Forbes, M. S., Thornhill, B. A., Antignac, C., Gubler, M.-C., Nevo, N., … Chevalier, R. L. (2015). The swan-neck lesion: proximal tubular adaptation to oxidative stress in nephropathic cystinosis. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, *308*(10), F1155–F1166. https://doi.org/10.1152/ajprenal.00591.2014

Gan, Q., Wang, X., Zhang, Q., Yin, Q., Jian, Y., Liu, Y., … Yang, C. (2019). The amino acid transporter SLC-36.1 cooperates with PtdIns3P 5-kinase to control phagocytic lysosome reformation. *The Journal of Cell Biology*, *218*(8), 2619–2637. https://doi.org/10.1083/jcb.201901074

Garcia, M. D., & Larina, I. V. (2014). Vascular development and hemodynamic force in the mouse yolk sac. *Frontiers in Physiology*, *5 AUG*(August), 1–10. https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00308

Gekle, M., Völker, K., Mildenberger, S., Freudinger, R., Shull, G. E., & Wiemann, M. (2004). NHE3 Na^+ /H^+ exchanger supports proximal tubular protein reabsorption in vivo. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, *287*(3), F469–F473. https://doi.org/10.1152/ajprenal.00059.2004

Gelineau-van Waes, J., Heller, S., Bauer, L. K., Wilberding, J., Maddox, J. R., Aleman, F., … Finnell, R. H. (2008). Embryonic development in the reduced folate carrier knockout mouse is modulated by maternal folate supplementation. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology*, *82*(7), 494–507. https://doi.org/10.1002/bdra.20453

Geyer, S. H., Maurer-Gesek, B., Reissig, L. F., & Weninger, W. J. (2017). High-resolution episcopic microscopy (HREM) - Simple and robust protocols for processing and visualizing organic materials. *Journal of Visualized Experiments*, *2017*(125). https://doi.org/10.3791/56071

Ghosh, P., Dahms, N. M., & Kornfeld, S. (2003). Mannose 6-phosphate receptors: new twists in the tale. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *4*(3), 202–213. https://doi.org/10.1038/nrm1050

Girardi, A. C. C., & Di Sole, F. (2012). Deciphering the mechanisms of the Na^+ /H^+ exchanger-3 regulation in organ dysfunction. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, *302*(11), C1569–C1587. https://doi.org/10.1152/ajpcell.00017.2012

Gleixner, E. M., Canaud, G., Hermle, T., Guida, M. C., Kretz, O., Helmstädter, M., … Simons, M. (2014). V-ATPase/mTOR Signaling Regulates Megalin-Mediated Apical Endocytosis. *Cell Reports*, *8*(1), 10–19. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.05.035

Goeden, N., Notarangelo, F. M., Pocivavsek, A., Beggiato, S., Bonnin, A., & Schwarcz, R. (2017). Prenatal Dynamics of Kynurenine Pathway Metabolism in Mice: Focus on Kynurenic Acid. *Developmental Neuroscience*, *39*(6), 519–528. https://doi.org/10.1159/000481168

Gosselet, F., Candela, P., Sevin, E., Berezowski, V., Cecchelli, R., & Fenart, L. (2009). Transcriptional profiles of receptors and transporters involved in brain cholesterol homeostasis at the blood–brain barrier: Use of an in vitro model. *Brain Research*, *1249*, 34–42. https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2008.10.036

Gude, N. M., Roberts, C. T., Kalionis, B., & King, R. G. (2004). Growth and function of the normal human placenta. *Thrombosis Research*, *114*(5-6 SPEC. ISS.), 397–407. https://doi.org/10.1016/j.thromres.2004.06.038

Harris, C., Jilek, J. L., Sant, K. E., Pohl, J., Reed, M., & Hansen, J. M. (2015). Amino acid starvation induced by protease inhibition produces differential alterations in redox status and the thiol proteome in organogenesis-stage rat embryos and visceral yolk sacs. *Journal of Nutritional Biochemistry*, *26*(12), 1589–1598. https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2015.07.026

Hatae, T., Ichimura, T., Ishida, T., & Sakurai, T. (1997). Apical tubular network in the rat kidney proximal tubule cells studied by thick-section and scanning electron microscopy. *Cell and Tissue Research*, *288*(2), 317–325. https://doi.org/10.1007/s004410050817

Hemmaplardh, D., & Morgan, E. H. (1977). The Role of Endocytosis in Transferrin Uptake by Reticulocytes and Bone Marrow Cells. *British Journal of Haematology*, *36*(1), 85–96. https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1977.tb05758.x

Heybrock, S., Kanerva, K., Meng, Y., Ing, C., Liang, A., Xiong, Z. J., … Neculai, D. (2019). Lysosomal integral membrane protein-2 (LIMP-2/SCARB2) is involved in lysosomal cholesterol export. *Nature Communications*, *10*(1). https://doi.org/10.1038/s41467-019-11425-0

Ho, E., Chen, G. M., & Bray, T. M. (1999). Supplementation of N-acteylcysteine inhibits NF-_k_B

activation and protects against alloxan-induced diabetes in CD-1 mice. *Faseb Journal*, *13*(113), 1845.

Howe, C. L., Granger, B. L., Hull, M., Green, S. A., Gabel, C. A., Helenius, A., & Mellman, I. (2006). Derived protein sequence, oligosaccharides, and membrane insertion of the 120-kDa lysosomal membrane glycoprotein (lgp120): identification of a highly conserved family of lysosomal membrane glycoproteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *85*(20), 7577–7581. https://doi.org/10.1073/pnas.85.20.7577

Hu, Y., Song, F., Jiang, H., Nuñez, G., & Smith, D. E. (2018). SLC15A2 and SLC15A4 Mediate the Transport of Bacterially Derived Di/Tripeptides To Enhance the Nucleotide-Binding Oligomerization Domain–Dependent Immune Response in Mouse Bone Marrow–Derived Macrophages. *The Journal of Immunology*, *201*(2), 652–662. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1800210

Huxham, I. M., & Beck, F. (1984). Characterization of exocoelomic fluid protein from rat conceptuses cultured in rat and human sera: a measure of yolk sac activity during organogenesis. *Development*, *84*(1).

Ivanova, E. A., De Leo, M. G., Van Den Heuvel, L., Pastore, A., Dijkman, H., De Matteis, M. A., & Levtchenko, E. N. (2015). Endo-lysosomal dysfunction in human proximal tubular epithelial cells deficient for lysosomal cystine transporter cystinosin. *PloS One*, *10*(3), e0120998. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120998

Ivanova, E. A., van den Heuvel, L. P., Elmonem, M. A., De Smedt, H., Missiaen, L., Pastore, A., … Levtchenko, E. N. (2016). Altered mTOR signalling in nephropathic cystinosis. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, *39*(3), 457–464. https://doi.org/10.1007/s10545-016-9919-z

Jaenecke, I., Boissel, J. P., Lemke, M., Rupp, J., Gasnier, B., & Closs, E. I. (2012). A chimera carrying the functional domain of the orphan protein SLC7A14 in the backbone of SLC7A2 mediates trans-stimulated arginine transport. *Journal of Biological Chemistry*, *287*(36), 30853–30860. https://doi.org/10.1074/jbc.M112.350322

Jauniaux, E., Jurkovic, D., & Campbell, S. (1995). Current topic: In Vivo investigation of the placental circulations by doppler echography. *Placenta*, *16*(4), 323–331. https://doi.org/10.1016/0143-4004(95)90089-6

Jauniaux, Eric, Watson, A. L., Hempstock, J., Bao, Y., Skepper, J. N., & Burton, G. J. (2000). *Onset of Maternal Arterial Blood Flow and Placental Oxidative Stress A Possible Factor in Human Early Pregnancy Failure*. *157*(6), 2111–2122.

Jeung, Y. J., Lee, K., Lee, H. J., Kim, E., Son, M. J., Ahn, J., … Chung, K. S. (2019). Cationic amino acid transporter PQLC2 is a potential therapeutic target in gastric cancer. *Cancer Science*, *110*(4), 1453–1463. https://doi.org/10.1111/cas.13966

Jezegou, A., Llinares, E., Anne, C., Kieffer-Jaquinod, S., O'Regan, S., Aupetit, J., … Gasnier, B. (2012). Heptahelical protein PQLC2 is a lysosomal cationic amino acid exporter underlying the action of cysteamine in cystinosis therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(50), E3434–E3443. https://doi.org/10.1073/pnas.1211198109

Johansson, M., Rocha, N., Zwart, W., Jordens, I., Janssen, L., Kuijl, C., … Neefjes, J. (2007). Activation of endosomal dynein motors by stepwise assembly of Rab7-RILP-p150Glued, ORP1L, and the receptor betalll spectrin. *The Journal of Cell Biology*, *176*(4), 459–471. https://doi.org/10.1083/jcb.200606077

Jung, J., Genau, H. M., & Behrends, C. (2015). Amino Acid-Dependent mTORC1 Regulation by the Lysosomal Membrane Protein SLC38A9. *Molecular and Cellular Biology*, *35*(14), 2479–2494. https://doi.org/10.1128/MCB.00125-15

Kakugawa, S., Langton, P. F., Zebisch, M., Howell, S. A., Chang, T. H., Liu, Y., … Vincent, J. P. (2015). Notum deacylates Wnt proteins to suppress signalling activity. *Nature*, *519*(7542), 187–192. https://doi.org/10.1038/nature14259

Kalantry, S., Manning, S., Haub, O., Tomihara-Newberger, C., Lee, H.-G., Fangman, J., … Lacy, E. (2001). The amnionless gene, essential for mouse gastrulation, encodes a visceral-endoderm–specific protein with an extracellular cysteine-rich domain. *Nature Genetics*, *27*(4), 412–416. https://doi.org/10.1038/86912

Kalatzis, V., Cherqui, S., Antignac, C., & Gasnier, B. (2001). Cystinosin, the protein defective in cystinosis, is a H+-driven lysosomal cystine transporter. *EMBO Journal*, *20*(21), 5940–5949. https://doi.org/10.1093/emboj/20.21.5940

Kast, D. J., & Dominguez, R. (2017). The Cytoskeleton–Autophagy Connection. *Current Biology*, *27*(8), R318–R326. https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.02.061

Katsuragi, Y., Ichimura, Y., & Komatsu, M. (2015). p62/SQSTM1 functions as a signaling hub and an autophagy adaptor. *FEBS Journal*, *282*(24), 4672–4678. https://doi.org/10.1111/febs.13540

Kawamura, N., Sun-Wada, G. H., Aoyama, M., Harada, A., Takasuga, S., Sasaki, T., & Wada, Y. (2012). Delivery of endosomes to lysosomes via microautophagy in the visceral endoderm of mouse embryos. *Nature Communications*, *3*(May), 1010–1071. https://doi.org/10.1038/ncomms2069

King, B. F., & Enders, A. C. (1970). Protein absorption and transport by the guinea pig visceral yolk sac placenta. *American Journal of Anatomy*, *129*(3), 261–287. https://doi.org/10.1002/aja.1001290303

Koike, S., Keino-Masu, K., & Masu, M. (2010). Deficiency of autotaxin/lysophospholipase D results in head cavity formation in mouse embryos through the LPA receptor-Rho-ROCK pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *400*(1), 66–71. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.08.008

Koike, S., Keino-Masu, K., Ohto, T., Sugiyama, F., Takahashi, S., & Masu, M. (2009). Autotaxin/lysophospholipase D-mediated lysophosphatidic acid signaling is required to form distinctive large lysosomes in the visceral endoderm cells of the mouse yolk Sac. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(48), 33561–33570. https://doi.org/10.1074/jbc.M109.012716

Komatsu, M., Waguri, S., Ueno, T., Iwata, J., Murata, S., Tanida, I., … Chiba, T. (2005). Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice. *Journal of Cell Biology*, *169*(3), 425–434. https://doi.org/10.1083/jcb.200412022

Kozyraki, R., & Gofflot, F. (2007). Multiligand Endocytosis and Congenital Defects: Roles of Cubilin, Megalin and Amnionless. *Current Pharmaceutical Design*, *13*(29), 3038–3046. https://doi.org/10.2174/138161207782110507

Krishna, S., Palm, W., Lee, Y., Yang, W., Bandyopadhyay, U., Xu, H., … Overholtzer, M. (2016). PIKfyve Regulates Vacuole Maturation and Nutrient Recovery following Engulfment. *Developmental Cell*, *38*(5), 536–547. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2016.08.001

Kuma, A., Hatano, M., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakaya, H., Yoshimori, T., … Mizushima, N. (2004). The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature*, *432*(7020), 1032–

1036. https://doi.org/10.1038/nature03029

Kur, E., Mecklenburg, N., Cabrera, R. M., Willnow, T. E., & Hammes, A. (2014). *LRP2 mediates folate uptake in the developing neural tube*. *2*, 2261–2268. https://doi.org/10.1242/jcs.140145

Kuravi, K., Nagotu, S., Krikken, A. M., Sjollema, K., Deckers, M., Erdmann, R., … van der Klei, I. (2006). Dynamin-related proteins Vps1p and Dnm1p control peroxisome abundance in Saccharomyces cerevisiae. *Journal of Cell Science*, *119*(19), 3994–4001. https://doi.org/10.1242/jcs.03166

Kwon, G. S., & Hadjantonakis, A.-K. (2009). *Transthyretin* mouse transgenes direct RFP expression or Cre-mediated recombination throughout the visceral endoderm. *Genesis*, *47*(7), 447–455. https://doi.org/10.1002/dvg.20522

Lamber, E. P., Siedenburg, A.-C., & Barr, F. A. (2019). Rab regulation by GEFs and GAPs during membrane traffic. *Current Opinion in Cell Biology*, *59*, 34–39. https://doi.org/10.1016/J.CEB.2019.03.004

Lambson, R. O. (1966). An electron microscopic visualization of transport across rat visceral yolk sac. *American Journal of Anatomy*, *118*(1), 21–51. https://doi.org/10.1002/aja.1001180104

Lee, Y., Nishizawa, T., Yamashita, K., Ishitani, R., & Nureki, O. (2015). Structural basis for the facilitative diffusion mechanism by SemiSWEET transporter. *Nature Communications*, *6*(1), 6112. https://doi.org/10.1038/ncomms7112

Levtchenko, E. N., de Graaf-Hess, A., Wilmer, M., van den Heuvel, L., Monnens, L., & Blom, H. (2005). Altered status of glutathione and its metabolites in cystinotic cells. *Nephrology Dialysis Transplantation*, *20*(9), 1828–1832. https://doi.org/10.1093/ndt/gfh932

Li, Jian, & Pfeffer, S. R. (2016). Lysosomal membrane glycoproteins bind cholesterol and contribute to lysosomal cholesterol export. *ELife*, *5*(September2016). https://doi.org/10.7554/eLife.21635

Li, Jun, Wang, H., Stoner, G. D., & Bray, T. M. (2002). Dietary supplementation with cysteine prodrugs selectively restores tissue glutathione levels and redox status in protein-malnourished mice. *Journal of Nutritional Biochemistry*, *13*(10), 625–633. https://doi.org/10.1016/S0955-2863(02)00218-8

Li, P., Gu, M., & Xu, H. (2018). Lysosomal Ion Channels as Decoders of Cellular Signals. *Trends in Biochemical Sciences*, *xx*. https://doi.org/10.1016/j.tibs.2018.10.006

Li, R.-J., Xu, J., Fu, C., Zhang, J., Zheng, Y. G., Jia, H., & Liu, J. O. (2016). Regulation of mTORC1 by lysosomal calcium and calmodulin. *ELife*, *5*, 1–16. https://doi.org/10.7554/elife.19360

Li, W. W., Li, J., & Bao, J. K. (2012, April). Microautophagy: Lesser-known self-eating. *Cellular and Molecular Life Sciences*, Vol. 69, pp. 1125–1136. https://doi.org/10.1007/s00018-011-0865-5

Liu, B., Du, H., Rutkowski, R., Gartner, A., & Wang, X. (2012). LAAT-1 Is the Lysosomal Lysine/Arginine Transporter That Maintains Amino Acid Homeostasis. *Science*, *337*(6092), 351–354. https://doi.org/10.1126/science.1220281

Lloyd, J. B. (1997). Lysosomes and teratogenesis: From hypothesis to dogma and back. *Reproductive Toxicology*, *11*(4), 589–594. https://doi.org/10.1016/S0890-6238(97)89178-2

Lobry, T., Miller, R., Nevo, N., Rocca, C. J., Zhang, J., Catz, S. D., … Cherqui, S. (2019). Interaction between galectin-3 and cystinosin uncovers a pathogenic role of inflammation in kidney involvement of cystinosis. *Kidney International*, *96*(2), 350–362.

https://doi.org/10.1016/j.kint.2019.01.029

Marat, A. L., Dokainish, H., & McPherson, P. S. (2011). DENN domain proteins: Regulators of Rab GTPases. *Journal of Biological Chemistry*, *286*(16), 13791–13800. https://doi.org/10.1074/jbc.R110.217067

Marco, P. De, & Merello, E. (2006). *Current perspectives on the genetic causes of neural tube defects*. 201–221. https://doi.org/10.1007/s10048-006-0052-2

Marshall, V. A., Johnson, K. J., Moore, N. P., Rasoulpour, R. J., Tornesi, B., & Carney, E. W. (2015). Comparative response of rat and rabbit conceptuses in vitro to inhibitors of histiotrophic nutrition. *Birth Defects Research Part B - Developmental and Reproductive Toxicology*, *104*(1), 1–10. https://doi.org/10.1002/bdrb.21134

Matheson, H., Veerbeek, J. H. W., Charnock-Jones, D. S., Burton, G. J., & Yung, H. W. (2016). Morphological and molecular changes in the murine placenta exposed to normobaric hypoxia throughout pregnancy. *Journal of Physiology*, *594*(5), 1371–1388. https://doi.org/10.1113/JP271073

McCullough, J., Clippinger, A. K., Talledge, N., Skowyra, M. L., Saunders, M. G., Naismith, T. V., … Frost, A. (2015). Structure and membrane remodeling activity of ESCRT-III helical polymers. *Science*, *350*(6267), 1548–1551. https://doi.org/10.1126/science.aad8305

Mejlvang, J., Olsvik, H., Svenning, S., Bruun, J. A., Abudu, Y. P., Larsen, K. B., … Johansen, T. (2018). Starvation induces rapid degradation of selective autophagy receptors by endosomal microautophagy. *The Journal of Cell Biology*, *217*(10), 3640–3655. https://doi.org/10.1083/jcb.201711002

Meng, J., & Ferguson, S. M. (2018). GATOR1-dependent recruitment of FLCN-FNIP to lysosomes coordinates Rag GTPase heterodimer nucleotide status in response to amino acids. *Journal of Cell Biology*, *217*(8), 2765–2776. https://doi.org/10.1083/jcb.201712177

Mijaljica, D., Prescott, M., & Devenish, R. J. (2011). Microautophagy in mammalian cells: Revisiting a 40-year-old conundrum. *Autophagy*, Vol. 7, pp. 673–682. https://doi.org/10.4161/auto.7.7.14733

Morgan, A. J., & Galione, A. (2014). Two-pore channels (TPCs): Current controversies. *BioEssays*, *36*(2), 173–183. https://doi.org/10.1002/bies.201300118

Morris, S. M. (2002). Dual roles for the Dab2 adaptor protein in embryonic development and kidney transport. *The EMBO Journal*, *21*(7), 1555–1564. https://doi.org/10.1093/emboj/21.7.1555

Mrakovic, A., Kay, J. G., Furuya, W., Brumell, J. H., & Botelho, R. J. (2012). Rab7 and Arl8 GTPases are Necessary for Lysosome Tubulation in Macrophages. *Traffic*, *13*(12), 1667–1679. https://doi.org/10.1111/tra.12003

Mrschtik, M., & Ryan, K. M. (2015). Lysosomal proteins in cell death and autophagy. *FEBS Journal*, *282*(10), 1858–1870. https://doi.org/10.1111/febs.13253

Mu, J., Slevin, J. C., Qu, D., McCormick, S., & Adamson, S. L. (2008). In vivo quantification of embryonic and placental growth during gestation in mice using micro-ultrasound. *Reproductive Biology and Endocrinology*, *6*, 1–13. https://doi.org/10.1186/1477-7827-6-34

Munson, M. J., Allen, G. F., Toth, R., Campbell, D. G., Lucocq, J. M., & Ganley, I. G. (2015). mTOR activates the VPS34-UVRAG complex to regulate autolysosomal tubulation and cell survival. *The*

EMBO Journal, *34*(17), 2272–2290. https://doi.org/10.15252/embj.201590992

Murakami, M., Ushio, Y., Mihara, Y., Kuratsu, J.-I., Horiuchi, S., & Morino, Y. (1990). Cholesterol uptake by human glioma cells via receptor-mediated endocytosis of low-density lipoprotein. *Journal of Neurosurgery*, *73*(5), 760–767. https://doi.org/10.3171/jns.1990.73.5.0760

Nesterova, G., & Gahl, W. (2008, June). Nephropathic cystinosis: Late complications of a multisystemic disease. *Pediatric Nephrology*, Vol. 23, pp. 863–878. https://doi.org/10.1007/s00467-007-0650-8

Nevo, N., Chol, M., Bailleux, A., Kalatzis, V., Morisset, L., Devuyst, O., … Antignac, C. (2010). Renal phenotype of the cystinosis mouse model is dependent upon genetic background. *Nephrology Dialysis Transplantation*, *25*(4), 1059–1066. https://doi.org/10.1093/ndt/gfp553

Nevo, Nathalie, Chol, M., Bailleux, A., Kalatzis, V., Morisset, L., Devuyst, O., … Antignac, C. (2010). Renal phenotype of the cystinosis mouse model is dependent upon genetic background. *Nephrology Dialysis Transplantation*, *25*(4), 1059–1066. https://doi.org/10.1093/ndt/gfp553

Nielsen, R., Christensen, E. I., & Birn, H. (2016). Megalin and cubilin in proximal tubule protein reabsorption: from experimental models to human disease. *Kidney International*, *89*(1), 58–67. https://doi.org/10.1016/j.kint.2015.11.007

Nile, A. H., & Hannoush, R. N. (2016). Fatty acylation of Wnt proteins. *Nature Chemical Biology*, *12*(2), 60–69. https://doi.org/10.1038/nchembio.2005

Nolin, A. C., Mulhern, R. M., Panchenko, M. V, Pisarek-Horowitz, A., Wang, Z., Shirihai, O., … Havasi, A. (2016). Proteinuria causes dysfunctional autophagy in the proximal tubule. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, *311*(6), F1271–F1279. https://doi.org/10.1152/ajprenal.00125.2016

Oka, M., Hashimoto, K., Yamaguchi, Y., Saitoh, S., Sugiura, Y., Motoi, Y., … Kontani, K. (2017). Arl8b is required for lysosomal degradation of maternal proteins in the visceral yolk sac endoderm of mouse embryos. *Journal of Cell Science*, *130*(20), 3568–3577. https://doi.org/10.1242/jcs.200519

Oku, M., & Sakai, Y. (2018). Three Distinct Types of Microautophagy Based on Membrane Dynamics and Molecular Machineries. *BioEssays*, *40*(6), 1800008. https://doi.org/10.1002/bies.201800008

Oleinikov, A. V, Zhao, J., & Makker, S. P. (2000). Cytosolic adaptor protein Dab2 is an intracellular ligand of endocytic receptor gp600/megalin. *The Biochemical Journal*, *347 Pt 3*, 613–621. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10769163

Onyenwoke, R. U., & Brenman, J. E. (2015, January 1). Lysosomal storage diseases-regulating neurodegeneration. *Journal of Experimental Neuroscience*, Vol. 9s2, pp. 81–91. https://doi.org/10.4137/JEN.S25475

Palikaras, K., Lionaki, E., & Tavernarakis, N. (2018). Mechanisms of mitophagy in cellular homeostasis, physiology and pathology. *Nature Cell Biology*, *20*(9), 1013–1022. https://doi.org/10.1038/s41556-018-0176-2

Palmieri, M., Impey, S., Kang, H., di Ronza, A., Pelz, C., Sardiello, M., & Ballabio, A. (2011). Characterization of the CLEAR network reveals an integrated control of cellular clearance pathways. *Human Molecular Genetics*, *20*(19), 3852–3866. https://doi.org/10.1093/hmg/ddr306

Palmieri, M., Pal, R., Nelvagal, H. R., Lotfi, P., Stinnett, G. R., Seymour, M. L., … Sardiello, M. (2017). Corrigendum: mTORC1-independent TFEB activation via Akt inhibition promotes cellular clearance in neurodegenerative storage diseases. *Nature Communications*, *8*(May 2016), 15793. https://doi.org/10.1038/ncomms15793

Pankiv, S., Clausen, T. H., Lamark, T., Brech, A., Bruun, J.-A., Outzen, H., … Johansen, T. (2007). p62/SQSTM1 Binds Directly to Atg8/LC3 to Facilitate Degradation of Ubiquitinated Protein Aggregates by Autophagy. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(33), 24131–24145. https://doi.org/10.1074/jbc.M702824200

Pereda T., J., & Motta, P. M. (1999). New advances in human embryology: morphofunctional relationship between the embryo and the yolk sac. *Medical Electron Microscopy*, *32*(2), 67–78. https://doi.org/10.1007/s007950050011

Petit, C. S., Roczniak-Ferguson, A., & Ferguson, S. M. (2013). Recruitment of folliculin to lysosomes supports the amino acid-dependent activation of rag gtpases. *Journal of Cell Biology*, *202*(7), 1107–1122. https://doi.org/10.1083/jcb.201307084

Pietrancosta, N., Anne, C., Prescher, H., Ruivo, R., Sagné, C., Debacker, C., … Gasnier, B. (2012). Successful prediction of substrate-binding pocket in SLC17 transporter sialin. *Journal of Biological Chemistry*, *287*(14), 11489–11497. https://doi.org/10.1074/jbc.M111.313056

Pietrzik, C., & Jaeger, S. (2008). Functional Role of Lipoprotein Receptors in Alzheimers Disease. *Current Alzheimer Research*, *5*(1), 15–25. https://doi.org/10.2174/156720508783884675

Pisoni, R L, Thoene, J. G., & Christensen, H. N. (1985). Detection and characterization of carrier-mediated cationic amino acid transport in lysosomes of normal and cystinotic human fibroblasts. Role in therapeutic cystine removal? *The Journal of Biological Chemistry*, *260*(8), 4791–4798. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3921538

Pisoni, Ronald L, Thoene, J. G., Christensen, H. N., & Biol, J. D. J. (1985). *Detection and Characterization of Carrier-mediated Cationic Amino Acid Transport in Lysosomes of Normal and Cystinotic Human Fibroblasts ROLE IN THERAPEUTIC CYSTINE*. *260*(8).

Pisoni, Ronald L, Thoene, J. G., Lemons, R. M., & Christensen, H. N. (1987). *Important Differences in Cationic Amino Acid Transport by Lysosomal System c and System y + of the Human Fibroblast **. *262*(31), 15011–15018.

Pitkin, R. M. (2007). Folate and neural tube defects. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *85*(1), 285S-288S. https://doi.org/10.1093/ajcn/85.1.285S

Piwon, N., Günther, W., Schwake, M., Bösl, M. R., & Jentsch, T. J. (2000). ClC-5 Cl--channel disruption impairs endocytosis in a mouse model for Dent's disease. *Nature*, *408*(6810), 369–373. https://doi.org/10.1038/35042597

Pu, J., Keren-Kaplan, T., & Bonifacino, J. S. (2017). A Ragulator-BORC interaction controls lysosome positioning in response to amino acid availability. *Journal of Cell Biology*, *216*(12), 4183–4197. https://doi.org/10.1083/jcb.201703094

Raggi, C., Luciani, A., Nevo, N., Antignac, C., Terryn, S., & Devuyst, O. (2014). Dedifferentiation and aberrations of the endolysosomal compartment characterize the early stage of nephropathic cystinosis. *Human Molecular Genetics*, *23*(9), 2266–2278. https://doi.org/10.1093/hmg/ddt617

Rebsamen, M., Pochini, L., Stasyk, T., de Araújo, M. E. G., Galluccio, M., Kandasamy, R. K., … Superti-Furga, G. (2015). SLC38A9 is a component of the lysosomal amino acid sensing machinery that

controls mTORC1. *Nature*, *519*(7544), 477–481. https://doi.org/10.1038/nature14107

Rega, L. R., Polishchuk, E., Montefusco, S., Napolitano, G., Tozzi, G., Zhang, J., … Emma, F. (2016). Activation of the transcription factor EB rescues lysosomal abnormalities in cystinotic kidney cells. *Kidney International*, *89*(4), 862–873. https://doi.org/10.1016/j.kint.2015.12.045

Repnik, U., Hafner ??esen, M., & Turk, B. (2014). Lysosomal membrane permeabilization in cell death: Concepts and challenges. *Mitochondrion*, *19*(Part A), 49–57. https://doi.org/10.1016/j.mito.2014.06.006

Risau, W., & Flamme, L. (1995). V Asculogenesis. *Cell Dev. Bioi*, *1*, 73–91.

Rong, Y., Liu, M., Ma, L., Du, W., Zhang, H., Tian, Y., … Yu, L. (2012). Clathrin and phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate regulate autophagic lysosome reformation. *Nature Cell Biology*, *14*(9), 924–934. https://doi.org/10.1038/ncb2557

Rong, Y., McPhee, C., Denga, S., Huanga, L., Chen, L., Liu, M., … Lenardo, M. J. (2011). Spinster is required for autophagic lysosome reformation and mTOR reactivation following starvation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(19), 7826–7831. https://doi.org/10.1073/pnas.1013800108

Ross, M. E. (2010). Gene-environment interactions, folate metabolism and the embryonic nervous system. *Wiley Interdisciplinary Reviews. Systems Biology and Medicine*, *2*(4), 471–480. https://doi.org/10.1002/wsbm.72

Rothman, J. H., Yamashiro, C. T., Raymond, C. K., Kane, P. M., & Stevens, T. H. (1989). Acidification of the lysosome-like vacuole and the vacuolar H+-ATPase are deficient in two yeast mutants that fail to sort vacuolar proteins. *Journal of Cell Biology*, *109*(1), 93–100. https://doi.org/10.1083/jcb.109.1.93

Ruivo, R., Anne, C., Sagné, C., & Gasnier, B. (2009). Molecular and cellular basis of lysosomal transmembrane protein dysfunction. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, *1793*(4), 636–649. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.12.008

Ruivo, R., Sharifi, A., Boubekeur, S., Morin, P., Anne, C., Debacker, C., … Gasnier, B. (2008). Molecular pathogenesis of sialic acid storage diseases: insight gained from four missense mutations and a putative polymorphism of human sialin. *Biology of the Cell*, *100*(9), 551–559. https://doi.org/10.1042/BC20070166

Rutsch, F., Gailus, S., Miousse, I. R., Suormala, T., Sagné, C., Toliat, M. R., … Nürnberg, P. (2009). Identification of a putative lysosomal cobalamin exporter altered in the cblF defect of vitamin B12 metabolism. *Nature Genetics*, *41*(2), 234–239. https://doi.org/10.1038/ng.294

Sadler, T. W. (2005). Embryology of neural tube development. *American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics*, *135C*(1), 2–8. https://doi.org/10.1002/ajmg.c.30049

Saffi, G. T., & Botelho, R. J. (2019). Lysosome Fission: Planning for an Exit. *Trends in Cell Biology*, 1–12. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2019.05.003

Saftig, P., & Klumperman, J. (2009a). Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *10*(9), 623–635. https://doi.org/10.1038/nrm2745

Saftig, P., & Klumperman, J. (2009b). Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: Trafficking meets function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *10*(9), 623–635.

https://doi.org/10.1038/nrm2745

Sagné, C., & Gasnier, B. (2008). Molecular physiology and pathophysiology of lysosomal membrane transporters. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, *31*(2), 258–266. https://doi.org/10.1007/s10545-008-0879-9

Sagné, Corinne, Agulhon, C., Ravassard, P., Darmon, M., Hamon, M., Mestikawy, S. El, … Giros, B. (2001). Identification and characterization of a lysosomal transporter for small neutral amino acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *98*(13), 7206–7211. https://doi.org/10.1073/PNAS.121183498

Sanderson, S. M., Gao, X., Dai, Z., & Locasale, J. W. (2019, November 1). Methionine metabolism in health and cancer: a nexus of diet and precision medicine. *Nature Reviews Cancer*, Vol. 19, pp. 625–637. https://doi.org/10.1038/s41568-019-0187-8

Sansanwal, P., Kambham, N., & Sarwal, M. M. (2010). Caspase-4 may play a role in loss of proximal tubules and renal injury in nephropathic cystinosis. *Pediatric Nephrology*, *25*(1), 105–109. https://doi.org/10.1007/s00467-009-1289-4

Sant, K. E., Dolinoy, D. C., Nahar, M. S., & Harris, C. (2013). Inhibition of proteolysis in histiotrophic nutrition pathways alters DNA methylation and one-carbon metabolism in the organogenesis-stage rat conceptus. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, *24*(8), 1479–1487. https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2012.12.007

Scalise, M., Galluccio, M., Pochini, L., Cosco, J., Trotta, M., Rebsamen, M., … Indiveri, C. (2019). Insights into the transport side of the human SLC38A9 transceptor. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, *1861*(9), 1558–1567. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2019.07.006

Schaftingen, E., Rzem, R., & Veiga-da-Cunha, M. (2009). L-2-Hydroxyglutaric aciduria, a disorder of metabolite repair. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, *32*(2), 135–142. https://doi.org/10.1007/s10545-008-1042-3

Schuh, A. C., Ho, J., Bernstein, A., Rossant, J., Schwartz, L., Fischer, K.-D., … Shalaby, F. (2004). A Requirement for Flk1 in Primitive and Definitive Hematopoiesis and Vasculogenesis. *Cell*, *89*(6), 981–990. https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80283-4

Sellier, C., Campanari, M., Julie Corbier, C., Gaucherot, A., Kolb-Cheynel, I., Oulad-Abdelghani, M., … Charlet-Berguerand, N. (2016). Loss of C9 ORF 72 impairs autophagy and synergizes with polyQ Ataxin-2 to induce motor neuron dysfunction and cell death . *The EMBO Journal*, *35*(12), 1276–1297. https://doi.org/10.15252/embj.201593350

Serefidou, M., Venkatasubramani, A. V., & Imhof, A. (2019). The Impact of One Carbon Metabolism on Histone Methylation. *Frontiers in Genetics*, *10*. https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00764

Settembre, C., Di Malta, C., Polito, V. A., Garcia, M., Vetrini, F., Erdin, S., … Ballabio, A. (2011). Europe PMC Funders Group Europe PMC Funders Author Manuscripts TFEB Links Autophagy to Lysosomal Biogenesis. *Science*, *332*(6036), 1429–1433. https://doi.org/10.1126/science.1204592.TFEB

Settembre, C., Zoncu, R., Medina, D. L., Vetrini, F., Erdin, S., Erdin, S., … Ballabio, A. (2012). A lysosome-to-nucleus signalling mechanism senses and regulates the lysosome via mTOR and TFEB. *EMBO Journal*, *31*(5), 1095–1108. https://doi.org/10.1038/emboj.2012.32

Sharifi, A., Kousi, M., Sagné, C., Bellenchi, G. C., Morel, L., Darmon, M., … Kyttälä, A. (2010). Expression and lysosomal targeting of CLN7, a major facilitator superfamily transporter

associated with variant late-infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Human Molecular Genetics*, *19*(22), 4497–4514. https://doi.org/10.1093/hmg/ddq381

Shen, K., & Sabatini, D. M. (2018). Ragulator and SLC38A9 activate the Rag GTPases through noncanonical GEF mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *115*(38), 9545–9550. https://doi.org/10.1073/PNAS.1811727115

Simonetti, B., & Cullen, P. J. (2019). Actin-dependent endosomal receptor recycling. *Current Opinion in Cell Biology*, *56*, 22–33. https://doi.org/10.1016/j.ceb.2018.08.006

Skowyra, M. L., Schlesinger, P. H., Naismith, T. V., & Hanson, P. I. (2018). Triggered recruitment of ESCRT machinery promotes endolysosomal repair. *Science*, *360*(6384). https://doi.org/10.1126/science.aar5078

Smith, B. T., Mussell, J. C., Fleming, P. A., Barth, J. L., Spyropoulos, D. D., Cooley, M. A., … Argraves, W. S. (2006). Targeted disruption of cubilin reveals essential developmental roles in the structure and function of endoderm and in somite formation. *BMC Developmental Biology*, *6*, 30. https://doi.org/10.1186/1471-213X-6-30

Spiegelstein, O., Mitchell, L. E., Merriweather, M. Y., Wicker, N. J., Zhang, Q., Lammer, E. J., & Finnell, R. H. (2004). Embryonic development of folate binding protein-1 (Folbp1) knockout mice: Effects of the chemical form, dose, and timing of maternal folate supplementation. *Developmental Dynamics*, *231*(1), 221–231. https://doi.org/10.1002/dvdy.20107

Spoelgen, R., Hammes, A., Anzenberger, U., Zechner, D., Andersen, O. M., Jerchow, B., & Willnow, T. E. (2005). LRP2/megalin is required for patterning of the ventral telencephalon. *Development*, *132*(2), 405–414. https://doi.org/10.1242/dev.01580

Sridhar, S., Patel, B., Aphkhazava, D., Macian, F., Santambrogio, L., Shields, D., & Cuervo, A. M. (2013). The lipid kinase PI4KIIIβ preserves lysosomal identity. *EMBO Journal*, *32*(3), 324–339. https://doi.org/10.1038/emboj.2012.341

Storm, T., Emma, F., Verroust, P. J., Hertz, J. M., Nielsen, R., & Christensen, E. I. (2011). A Patient with Cubilin Deficiency. *New England Journal of Medicine*, *364*(1), 89–91. https://doi.org/10.1056/NEJMc1009804

Sullivan, P. M., Zhou, X., Robins, A. M., Paushter, D. H., Kim, D., Smolka, M. B., & Hu, F. (2016). The ALS/FTLD associated protein C9orf72 associates with SMCR8 and WDR41 to regulate the autophagy-lysosome pathway. *Acta Neuropathologica Communications*, *4*(1), 51. https://doi.org/10.1186/s40478-016-0324-5

Sumayao, R., McEvoy, B., Newsholme, P., & McMorrow, T. (2016). Lysosomal cystine accumulation promotes mitochondrial depolarization and induction of redox-sensitive genes in human kidney proximal tubular cells. *Journal of Physiology*, *594*(12), 3353–3370. https://doi.org/10.1113/JP271858

Swanson, J., Bushnell, A., & Silverstein, S. C. (2006). Tubular lysosome morphology and distribution within macrophages depend on the integrity of cytoplasmic microtubules. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *84*(7), 1921–1925. https://doi.org/10.1073/pnas.84.7.1921

Takiguchi, M., & Mori, M. (1995). Transcriptional regulation of genes for ornithine cycle enzymes. *Biochemical Journal*, Vol. 312, pp. 649–659. https://doi.org/10.1042/bj3120649

Tao, Y., Cheung, L. S., Li, S., Eom, J.-S., Chen, L.-Q., Xu, Y., … Feng, L. (2015). Structure of a eukaryotic SWEET transporter in a homotrimeric complex. *Nature*, *527*(7577), 259–263.

https://doi.org/10.1038/nature15391

Tenten, V., Menzel, S., Kunter, U., Sicking, E. M., Van Roeyen, C. R. C., Sanden, S. K., … Moeller, M. J. (2013). Albumin is recycled from the primary urine by tubular transcytosis. *Journal of the American Society of Nephrology*, *24*(12), 1966–1980. https://doi.org/10.1681/ASN.2013010018

Thoene, J. G., & Lemons, R. M. (1982). Cystine accumulation in cystinotic fibroblasts from free and protein-linked cystine but not cysteine. *Biochemical Journal*, *208*(3), 823–830. https://doi.org/10.1042/bj2080823

Thoene, J. G., Oshima, R. G., & Crawhall, J. C. (1976). Intracellular cystine depletion by aminothiols in vitro and in vivo. *Journal of Clinical Investigation*, *58*(1), 180–189. https://doi.org/10.1172/JCI108448

Toriyama, M., Toriyama, M., Wallingford, J. B., & Finnell, R. H. (2017). Folate-dependent methylation of septins governs ciliogenesis during neural tube closure. *The FASEB Journal*, *31*(8), 3622–3635. https://doi.org/10.1096/fj.201700092R

Troakes, C., Maekawa, S., Wijesekera, L., Rogelj, B., Siklós, L., Bell, C., … Al-Sarraj, S. (2012). An MND/ALS phenotype associated with *C9orf72* repeat expansion: Abundant p62-positive, TDP-43-negative inclusions in cerebral cortex, hippocampus and cerebellum but without associated cognitive decline. *Neuropathology*, *32*(5), 505–514. https://doi.org/10.1111/j.1440-1789.2011.01286.x

Ufer. (2011). The roles of glutathione peroxidases during embryo development. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *4*(July), 1–14. https://doi.org/10.3389/fnmol.2011.00012

Ugolino, J., Ji, Y. J., Conchina, K., Chu, J., Nirujogi, R. S., Pandey, A., … Wang, J. (2016). Loss of C9orf72 Enhances Autophagic Activity via Deregulated mTOR and TFEB Signaling. *PLoS Genetics*, *12*(11), 1–26. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006443

van Amerongen, R., & Berns, A. (2006, December). Knockout mouse models to study Wnt signal transduction. *Trends in Genetics*, Vol. 22, pp. 678–689. https://doi.org/10.1016/j.tig.2006.10.001

van Veen, S., Martin, S., Van den Haute, C., Benoy, V., Lyons, J., Vanhoutte, R., … Vangheluwe, P. (2020). ATP13A2 deficiency disrupts lysosomal polyamine export. *Nature*, *578*(7795), 419–424. https://doi.org/10.1038/s41586-020-1968-7

Verdon, Q., Boonen, M., Ribes, C., Jadot, M., Gasnier, B., & Sagné, C. (2017). SNAT7 is the primary lysosomal glutamine exporter required for extracellular protein-dependent growth of cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *114*(18), E3602–E3611. https://doi.org/10.1073/pnas.1617066114

Veys, K. R. P., Besouw, M. T. P., Pinxten, A. M., Dyck, M. Van, Casteels, I., & Levtchenko, E. N. (2016). Cystinosis: a new perspective. *Acta Clinica Belgica: International Journal of Clinical and Laboratory Medicine*, *71*(3), 131–137. https://doi.org/10.1179/2295333714Y.0000000113

von Muhlinen, N., Thurston, T., Ryzhako, G., Bloor, S., & Randow, F. (2010). NDP52, a novel autophagy receptor for ubiquitin-decorated cytosolic bacteria. *Autophagy*, *6*(2), 288–289. https://doi.org/10.4161/auto.6.2.11118

Wada, Y. (2013). Vacuoles in mammals: a subcellular structure indispensable for early embryogenesis. *Bioarchitecture*, Vol. 3, pp. 13–19. https://doi.org/10.4161/bioa.24126

Wada, Y., Sun-Wada, G.-H., & Kawamura, N. (2013). Microautophagy in the visceral endoderm is essential for mouse early development. *Autophagy*, *9*(2), 252–254. https://doi.org/10.4161/auto.22585

Wallingford, M. C., & Giachelli, C. M. (2014). Loss of PiT-1 results in abnormal endocytosis in the yolk sac visceral endoderm. *Mechanisms of Development*, *133*, 189–202. https://doi.org/10.1016/j.mod.2014.08.001

Wang, J., Alexander, P., Wu, L., Hammer, R., Cleaver, O., & McKnight, S. L. (2009). Dependence of Mouse Embryonic Stem Cells on Threonine Catabolism. *Science*, *325*(5939), 435–439. https://doi.org/10.1126/science.1173288

Wang, S., Tsun, Z.-Y., Wolfson, R., Shen, K., Wyant, G. A., Plovanich, M. E., … Sabatini, D. M. (2015). The amino acid transporter SLC38A9 is a key component of a lysosomal membrane complex that signals arginine sufficiency to mTORC1. *Science*, *347*(6218), 188–194. https://doi.org/10.1126/science.1257132

Wang, W., Gao, Q., Yang, M., Zhang, X., Yu, L., Lawas, M., … Xu, H. (2015). Up-regulation of lysosomal TRPML1 channels is essential for lysosomal adaptation to nutrient starvation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *112*(11), E1373–E1381. https://doi.org/10.1073/pnas.1419669112

Wang, X., Zhang, X., Dong, X. P., Samie, M., Li, X., Cheng, X., … Xu, H. (2012). TPC proteins are phosphoinositide- Activated sodium-selective ion channels in endosomes and lysosomes. *Cell*, *151*(2), 372–383. https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.08.036

Webster, C. P., Smith, E. F., Bauer, C. S., Moller, A., Hautbergue, G. M., Ferraiuolo, L., … De Vos, K. J. (2016). The C9orf72 protein interacts with Rab1a and the ULK 1 complex to regulate initiation of autophagy. *The EMBO Journal*, *35*(15), 1656–1676. https://doi.org/10.15252/embj.201694401

Webster, C. P., Smith, E. F., Grierson, A. J., & De Vos, K. J. (2018). C9orf72 plays a central role in Rab GTPase-dependent regulation of autophagy. *Small GTPases*, *9*(5), 399–408. https://doi.org/10.1080/21541248.2016.1240495

Whang, M. I., Tavares, R. M., Benjamin, D. I., Kattah, M. G., Advincula, R., Nomura, D. K., … Ma, A. (2017). The Ubiquitin Binding Protein TAX1BP1 Mediates Autophagasome Induction and the Metabolic Transition of Activated T Cells. *Immunity*, *46*(3), 405–420. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.02.018

White, C., Yuan, X., Schmidt, P. J., Bresciani, E., Samuel, T. K., Campagna, D., … Hamza, I. (2013). HRG1 is essential for heme transport from the phagolysosome of macrophages during erythrophagocytosis. *Cell Metabolism*, *17*(2), 261–270. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.01.005

Wild, A. E., Lloyd, J. B., & Hemmings, W. A. (1975). Role of the Cell Surface in Selection during Transport of Proteins from Mother to Foetus and Newly Born [and Discussion]. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *271*(912), 395–410. https://doi.org/10.1098/rstb.1975.0060

Wild, Arthur E. (1992). The role of yolk sac and gut epithelial cells in maternal immunoglobulin transport. In *Epithelial Organization and Development* (pp. 273–298). https://doi.org/10.1007/978-94-011-2354-9_10

Wild, P., Farhan, H., McEwan, D. G., Wagner, S., Rogov, V. V., Brady, N. R., … Dikic, I. (2011). Phosphorylation of the Autophagy Receptor Optineurin Restricts Salmonella Growth. *Science*,

333(6039), 228–233. https://doi.org/10.1126/science.1205405

Willnow, T. E., Hilpert, J., Armstrong, S. A., Rohlmann, A., Hammer, R. E., Burns, D. K., & Herz, J. (1996). Defective forebrain development in mice lacking gp330/megalin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *93*(16), 8460–8464. https://doi.org/10.1073/pnas.93.16.8460

Woods, L., Perez-Garcia, V., & Hemberger, M. (2018). Regulation of Placental Development and Its Impact on Fetal Growth—New Insights From Mouse Models. *Frontiers in Endocrinology*, *9*(September), 1–18. https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00570

Wyant, G. A., Abu-Remaileh, M., Wolfson, R. L., Chen, W. W., Freinkman, E., Danai, L. V., … Sabatini, D. M. (2017). mTORC1 Activator SLC38A9 Is Required to Efflux Essential Amino Acids from Lysosomes and Use Protein as a Nutrient. *Cell*, *171*(3), 642-654.e12. https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.09.046

Xiong, J., & Zhu, M. X. (2016, August 1). Regulation of lysosomal ion homeostasis by channels and transporters. *Science China Life Sciences*, Vol. 59, pp. 777–791. https://doi.org/10.1007/s11427-016-5090-x

Yang, B., Treweek, J. B., Kulkarni, R. P., Deverman, B. E., Chen, C. K., Lubeck, E., … Gradinaru, V. (2014). Single-cell phenotyping within transparent intact tissue through whole-body clearing. *Cell*, *158*(4), 945–958. https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.07.017

Yang, Y., Xu, M., Zhu, X., Yao, J., Shen, B., & Dong, X. P. (2019). Lysosomal Ca 2+ release channel TRPML1 regulates lysosome size by promoting mTORC1 activity. *European Journal of Cell Biology*. https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2019.05.001

Ybot-Gonzalez, P., Cogram, P., Gerrelli, D., & Copp, A. J. (2002). Sonic hedgehog and the molecular regulation of mouse neural tube closure. *Development (Cambridge, England)*, *129*(10), 2507–2517. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11973281

Ybot-Gonzalez, P., Gaston-Massuet, C., Girdler, G., Klingensmith, J., Arkell, R., Greene, N. D. E., & Copp, A. J. (2007). Neural plate morphogenesis during mouse neurulation is regulated by antagonism of Bmp signalling. *Development (Cambridge, England)*, *134*(17), 3203–3211. https://doi.org/10.1242/dev.008177

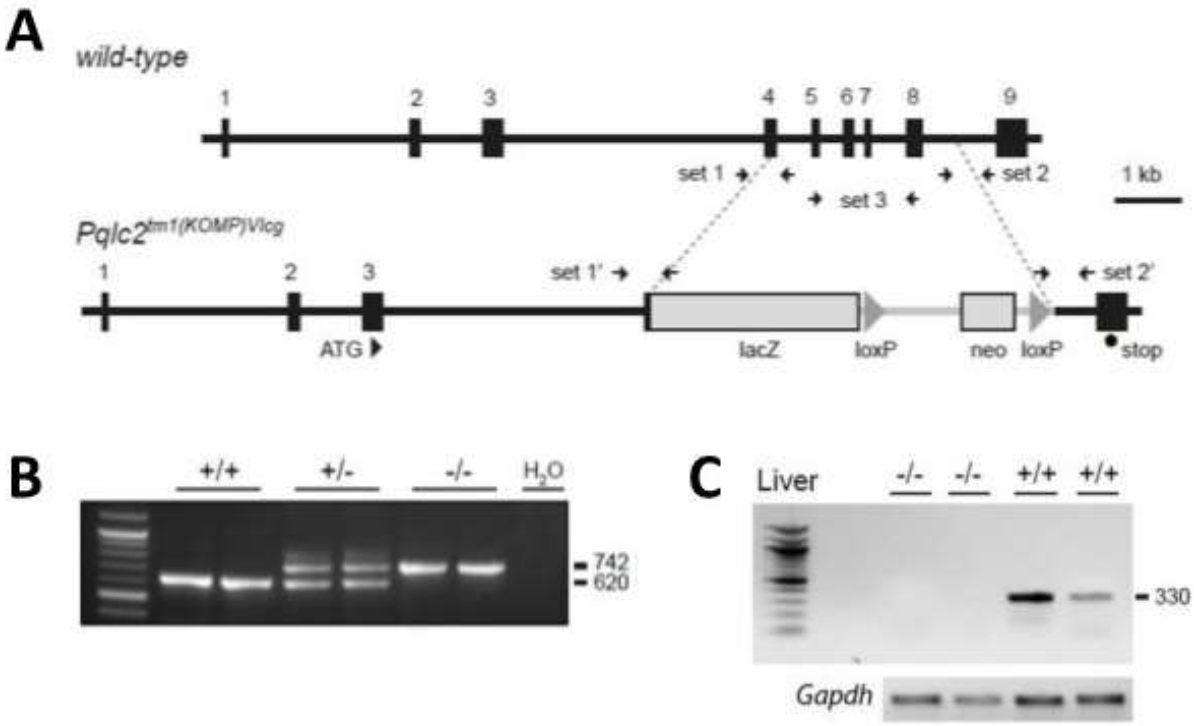
Young, D., Klemm, A. R., Beckman, D. A., Brent, R. L., & Lloyd, J. B. (1997). Uptake and processing of 59Fe-labelled and 125I-labelled rat transferrin by early organogenesis rat conceptuses in vitro. *Placenta*, *18*(7), 553–562. https://doi.org/10.1016/0143-4004(77)90010-8

Youngdahl-Turner, P., Mellman, I. S., Allen, R. H., & Rosenberg, L. E. (1979). Protein mediated vitamin uptake. *Experimental Cell Research*, *118*(1), 127–134. https://doi.org/10.1016/0014-4827(79)90590-1

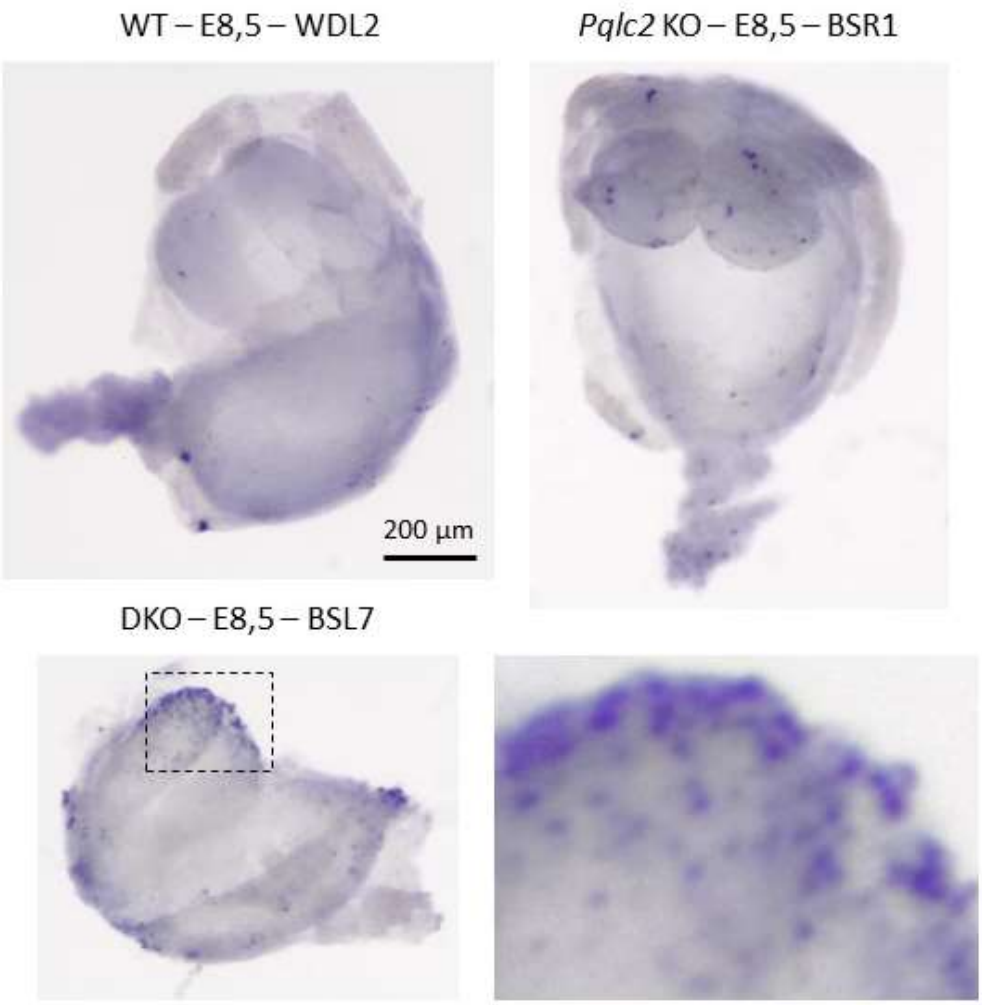
Zhang, J., Johnson, J. L., He, J., Napolitano, G., Ramadass, M., Rocca, C., … Catz, S. D. (2017). Cystinosin, the small GTPase Rab11, and the Rab7 effector RILP regulate intracellular trafficking of the chaperone-mediated autophagy receptor LAMP2A. *The Journal of Biological Chemistry*, *292*(25), 10328–10346. https://doi.org/10.1074/jbc.M116.764076

Zohn, I. E., & Sarkar, A. A. (2010). The visceral yolk sac endoderm provides for absorption of nutrients to the embryo during neurulation. *Birth Defects Research Part A - Clinical and Molecular Teratology*, *88*(8), 593–600. https://doi.org/10.1002/bdra.20705

ANNEXES



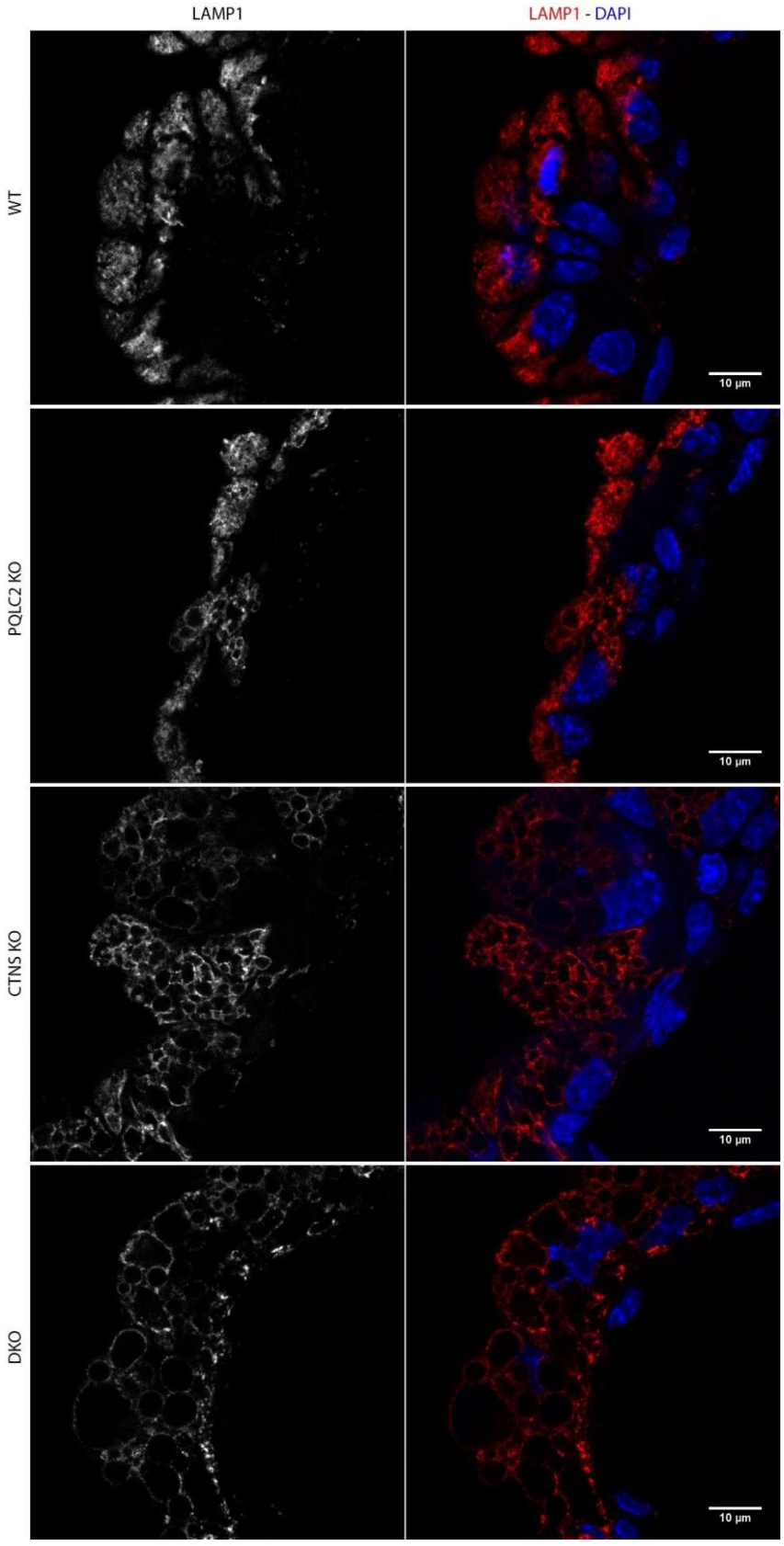
Annexe 1 : (A) Topologie des gènes *Pqlc2* sauvage (wild-type) et muté. **(B)** Amplicons obtenus avec les amorces de génotypage de *Pqlc2* permettant de discriminer WT / KO. **(C)** Transcrits ARNm de *Pqlc2* dans le foie de souris WT ou KO.
Adapté de Xavier Leray, données non publiées



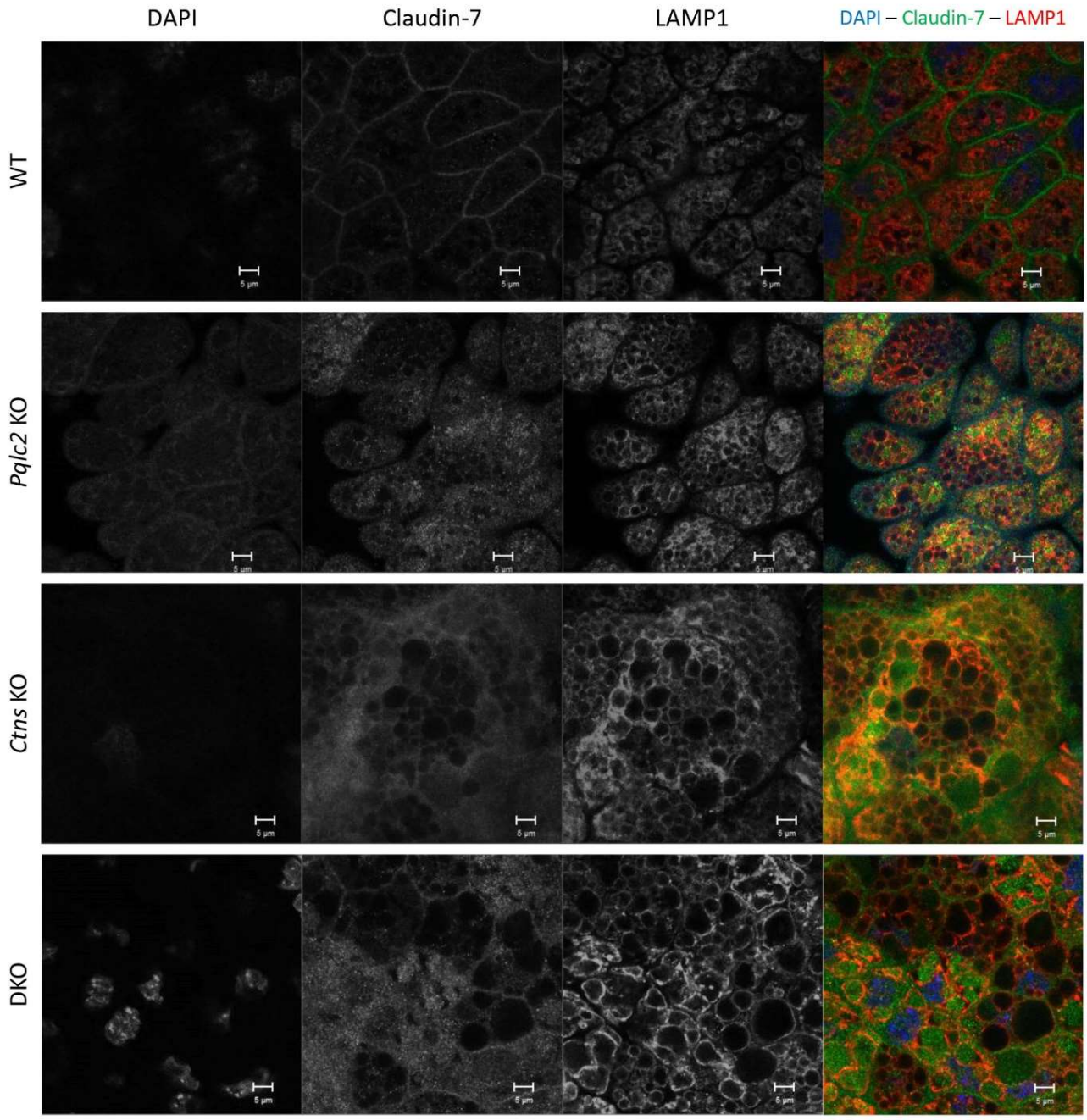
Annexe 2 : Expérience préliminaire de détection d'apoptose sur embryons précoces. Des embryons de souris au stade E8,5 ont été extraits, puis marqués à l'aide de la technique de TUNEL pour détecter l'apoptose. L'embryon DKO et le *Pqlc2* KO sont issus de la même portée.
Expérience réalisée avec Cécile Jouffret, ingénieure au laboratoire



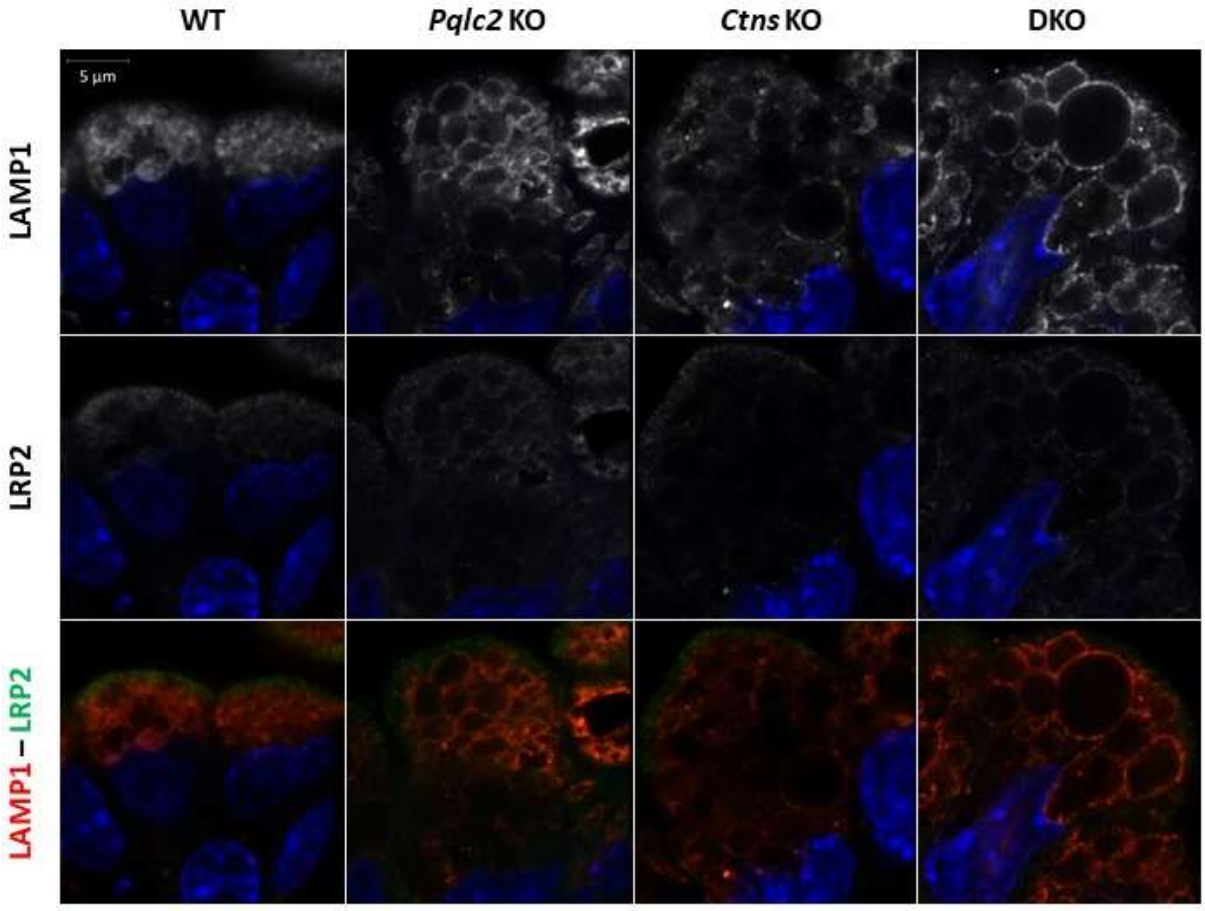
Annexe 3 : Sections transversales d'embryons de souris WT au stade E12,5 disponibles dans l'atlas d'histologie embryonnaire de Kaufman. Les sections montrées ici correspondent aux plan montrés pour le *Pqlc2* KO. Ordre de lecture : caudal → rostral. Pôle dorsal en haut, pôle ventral en bas.
Adapté de : Graham, E., Moss, J., Burton, N., Armit, C., Richardson, L., & Baldock, R. (2015). The atlas of mouse development eHistology resource. Development (Cambridge), 142(11), 1909–1911.



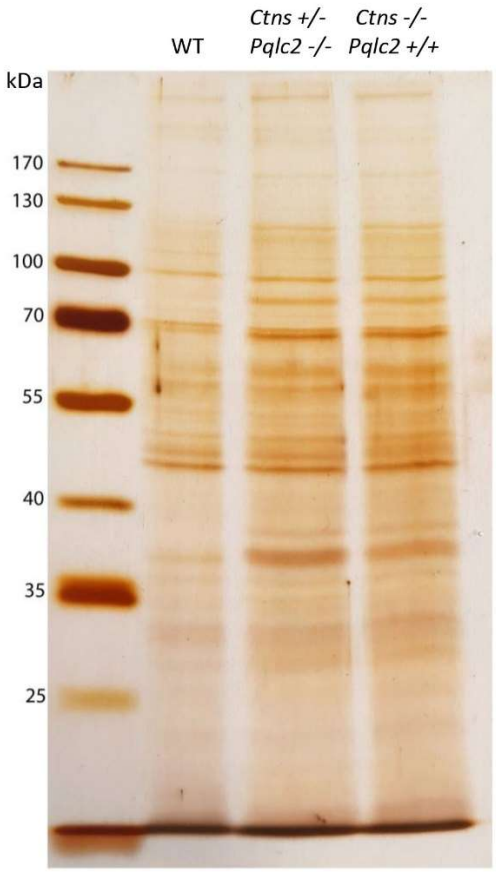
Annexe 4 : Autre exemple du phénotype de vacuolisation des compartiments LAMP1 dans les CESVV KO pour *Ctns* et/ou *Pqlc2* à E10,5. Images réalisées au microscope confocal Zeiss LSM 880. Echantillons : WT = WJL1 ; *Pqlc2* KO = CBL6 ; *Ctns* KO = ATR4 ; DKO = CBL5.



Annexe 5 : Perturbations des jonctions serrées dans la couche endodermale du sac vitellin viscéral d'embryons de souris dépourvus de *Ctns* et/ou de *Pqlc2*. Détection du marqueur (endo)lysosomal LAMP1 et du marqueur des jonctions serrées Claudin-7 par immunofluorescence sur sacs vitellins entiers (whole mount) d'embryons de souris WT et KO pour *Ctns* et/ou *Pqlc2*, au stade E10,5 de développement. Vue du pôle apical. *Données Dr. Isabelle Fanget, utilisées avec autorisation. Imagerie au microscope confocal Zeiss LSM 880.*



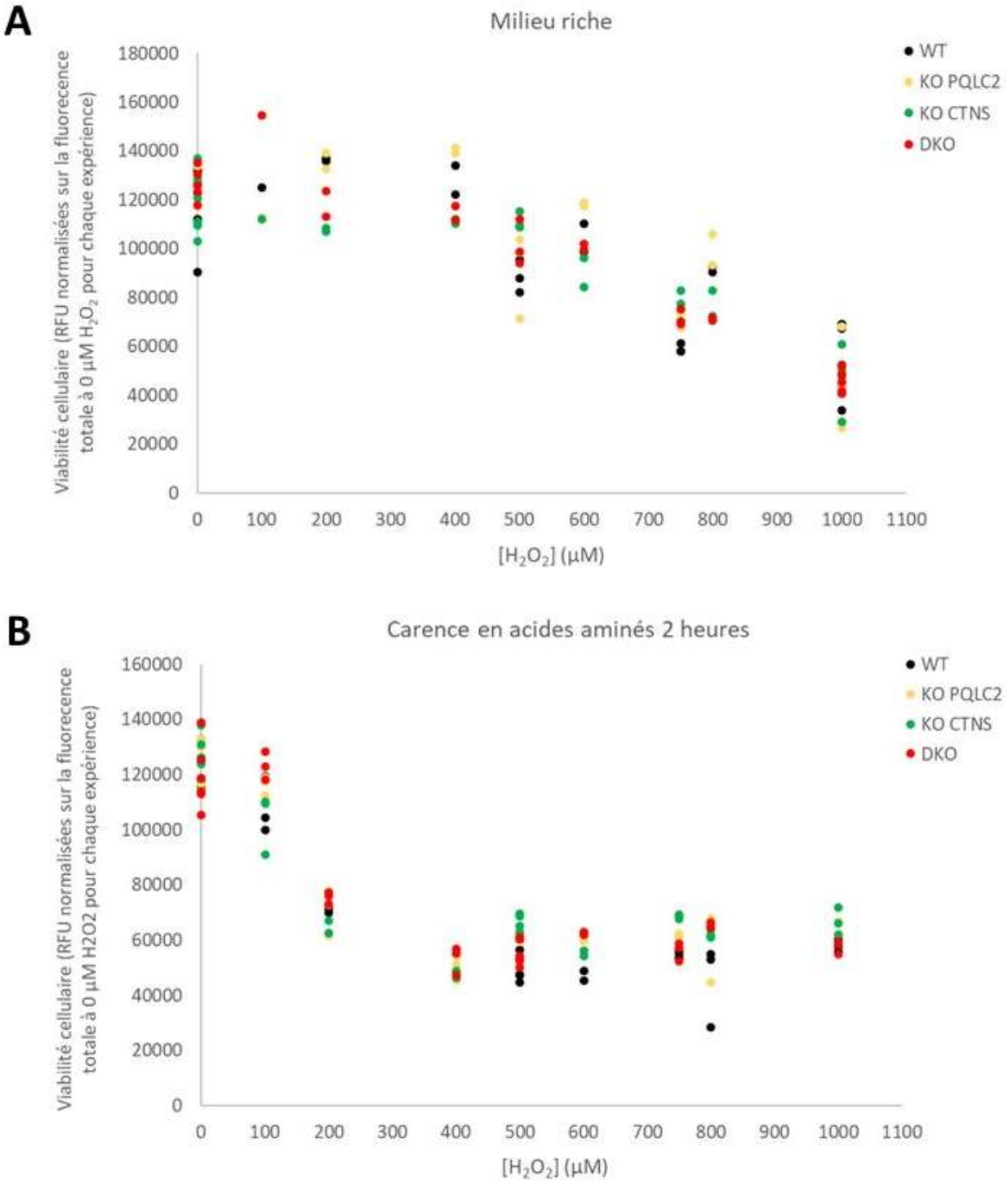
Annexe 6 : Co-marquage de LAMP1 et LRP2 en IF sur sac vitellin. Des cryosections de sacs vitellins WT et KO pour *Ctns* et/ou *Pqlc2* ont été utilisés pour détecter LAMP1 et la mégaline (LRP2) par IF et microscopie confocale. *Acquisition Zeiss LSM880. Echantillons biologiques : WT = WTI6 ; Pqlc2 KO = DKL1 ; Ctns KO = DI1 ; DKO = DF2*



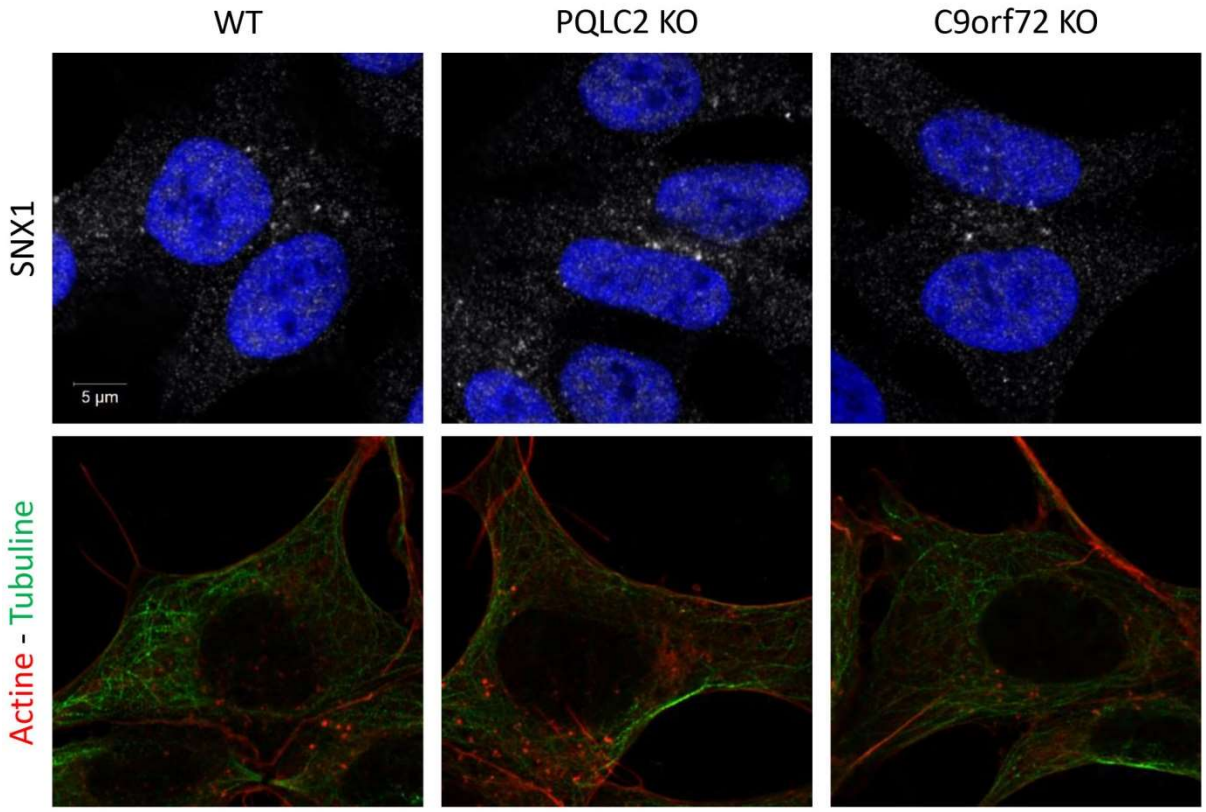
Annexe 7 : Expérience préliminaire réalisée avec des lysats de sacs vitellins de différents génotypes au stade E8,5 montrant des variations dans le profil de protéines. Lysats déposés à hauteur de 2 µg de protéines par piste puis séparés par SDS-PAGE sur un gel à 10% acryl-bisacrylamide, puis coloré au nitrate d'argent. *Echantillons biologiques : WT = WJ'L4 ; triallélique Ctns +/- Pqlc2 -/- = CAR1 ; Ctns KO = BXL1*

	Non supplémenté		Arginine		Lysine		Histidine		Citruline	
Product #	**D10012G**		**D18043002**		**D18043003**		**D18043004**		**D18043005**	
	gm%	*kcal%*	gm%	*kcal%*	gm%	*kcal%*	gm%	*kcal%*	gm%	*kcal%*
Protein	20	20	25	25	24	24	24	24	25	25
Carbohydrate	64	64	59	59	60	60	60	60	59	59
Fat	7	16	7	16	7	16	7	16	7	16
Total		*100*		*100*		*100*		*100*		*100*
kcal/gm	4.0		4.0		4.0		4.0		4.0	
Ingredient	**gm**	***kcal***	**gm**	***kcal***	**gm**	***kcal***	**gm**	***kcal***	**gm**	***kcal***
Casein	200	*800*	200	*800*	200	*800*	200	*800*	200	*800*
L-Arginine	0	*0*	44.9	*180*	0	*0*	0	*0*	0	*0*
L-Histidine	0	*0*	0	*0*	40	*160*	0	*0*	0	*0*
L-Lysine, HCl	0	*0*	0	*0*	0	*0*	37.7	*151*	0	*0*
L-Citrulline	0	*0*	0	*0*	0	*0*	0	*0*	45.1	*180*
L-Cystine	3	*12*	3	*12*	3	*12*	3	*12*	3	*12*
Corn Starch	397.486	*1590*	352.586	*1410*	357.486	*1430*	359.786	*1439*	352.386	*1410*
Maltodextrin 10	132	*528*	132	*528*	132	*528*	132	*528*	132	*528*
Sucrose	100	*400*	100	*400*	100	*400*	100	*400*	100	*400*
Cellulose, BW200	50	*0*	50	*0*	50	*0*	50	*0*	50	*0*
Inulin	0	*0*	0	*0*	0	*0*	0	*0*	0	*0*
Soybean Oil	70	*630*	70	*630*	70	*630*	70	*630*	70	*630*
t-Butylhydroquinone	0.014	*0*	0.014	*0*	0.014	*0*	0.014	*0*	0.014	*0*
Mineral Mix S10022G	35	*0*	35	*0*	35	*0*	35	*0*	35	*0*
Vitamin Mix V10037	10	*40*	10	*40*	10	*40*	10	*40*	10	*40*
Choline Bitartrate	2.5	*0*	2.5	*0*	2.5	*0*	2.5	*0*	2.5	*0*
FD&C Yellow Dye #5	0	*0*	0.05	*0*	0	*0*	0	*0*	0.025	*0*
FD&C Red Dye #40	0	*0*	0	*0*	0.05	*0*	0	*0*	0	*0*
FD&C Blue Dye #1	0	*0*	0	*0*	0	*0*	0.05	*0*	0.025	*0*
Total	**1000**	**4000**	**1000.05**	**4000**	**1000.05**	**4000**	**1000.05**	**4000**	**1000.05**	**4000**

Annexe 8 : Composition des granulés utilisés pour l'expérience de supplémentation nutritionnelle des souris gravides.



Annexe 9 : Viabilité des cellules HAP1 WT et KO pour *Ctns* et/ou *Pqlc2* soumises à un stress exogène. Des cellules HAP1 WT, *Pqlc2* KO, *Ctns* KO et DKO sont soit **(A)** maintenues en milieu complet (IMDM avec 10% de sérum dialysé*) soit **(B)** soumises à une carence en acides aminés pendant deux heures (EBSS avec 10% de sérum dialysé*), et subissent en plus un stress avec des concentrations croissantes de peroxyde d'hydrogène. Un kit Presto Blue (ref. Thermo Fisher A13261) est utilisé pour estimer la viabilité cellulaire en fonction de la quantité de fluorescence émise. Les graphes présentés ici correspondent aux données de 5 expériences indépendantes ; pour pouvoir les comparer, les valeurs de fluorescence de toutes les mesure ont été ajustées par un facteur normalisant le niveau moyen basal de fluorescence obtenu en l'absence de stress exogène (0 µM H_2O_2) par rapport au niveau moyen basal le plus faible de ces 5 expériences.
** utilisé comme alternative au sérum de veau fœtal qui possède une activité catalase endogène*



Annexe 10 : Pas de différence évidente des endosomes précoces et du cytosquelette entre les cellules HAP1 WT et KO pour PQLC2 ou C9orf72. Détection par immunofluorescence* et microscopie confocale des protéines Sorting Nexin 1 (SNX1), marqueur des endosomes précoces, et du cytosquelette d'actine/tubuline sur cellules HAP1 fixées WT et KO pour PQLC2 ou C9orf72.
**sauf actine, détecté par phalloïdine–AF555*

Annexe 11 : Modulation artificielle du potentiel de membrane lysosomale par la composition ionique du tampon

Contrairement au modèle d'ovocyte de xénope (ou à des modèles de lysosomes élargis non implémentés au laboratoire) utilisé de pair avec une approche d'électrophysiologie, il n'est pas possible d'imposer un potentiel connu à la membrane des lysosomes. En réalité le potentiel de membrane des lysosomes est mal connu, et l'hétérogénéité de ces organites rend très difficile l'estimation de ce paramètre. Les perméabilités de la membrane lysosomale à certaines espèces ioniques sont particulièrement importantes pour l'établissement du potentiel de membrane : les protons, le sodium et le potassium. En fonction des concentrations luminales estimées de ces différentes espèces ioniques (P. Li et al., 2018), on peut faire une estimation de comment la composition ionique du tampon dans lequel les lysosomes sont resuspendus va influencer le potentiel. Le chlore et le calcium jouent également un rôle dans l'établissement de ce potentiel.



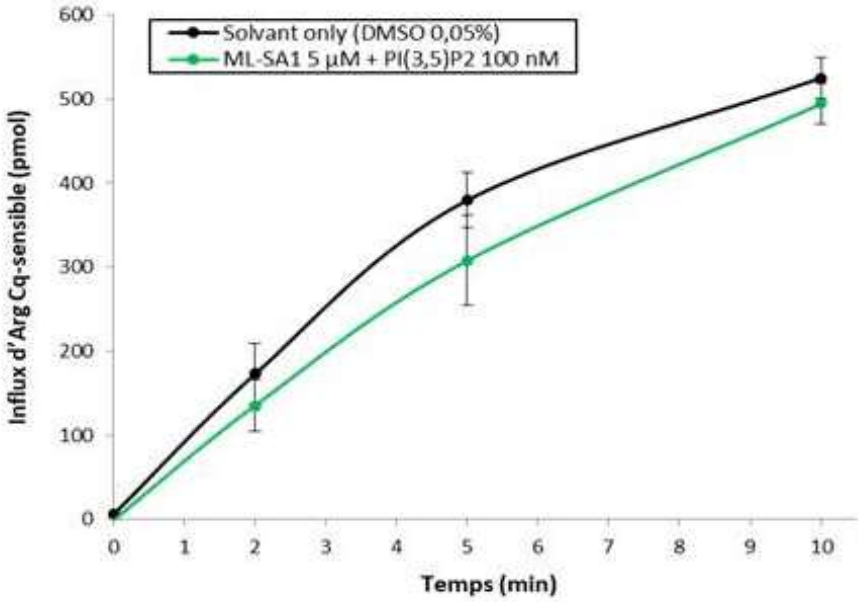
	Tampon		
	Sodium gluconate	Sucrose	Sodium gluconate
[Na+]	125 mM	0 mM	125 mM
pH	6,0	6,0	7,4
Potentiel d'équilibre	$E(Na^+) = 5$ mV $E(H^+) = 89$ mV	$E(Na^+) = 129$ mV * $E(H^+) = 89$ mV * *approx. à 1 mM*	$E(Na^+) = 5$ mV $E(H^+) = 172$ mV

Nous avons pour cela utilisé l'approche suivante (voir tableau ci-dessus) : les lysosomes sont repris dans trois tampons dont la composition ionique, en l'occurrence la composition en sodium et en protons, est différente. Les concentrations de chaque ion ont été ajustées afin que leur potentiel d'équilibre, évalué à partir de l'équation de Nernst (voir ci-dessous), accroisse ou diminue le potentiel électrique de membrane.

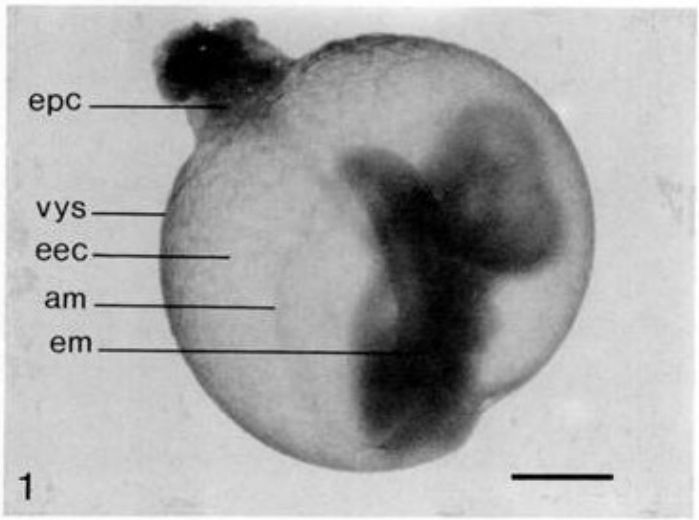
$$E(ion) = ln\left(\frac{[ion]out}{[ion]in}\right) \times \frac{RT}{ZF}$$

(avec R = constante des gaz parfaits = 8,314 462 1 J mol−1 K^{-1} ; T = température absolue (soit 298,15 K pour 25°C) ; Z = valence de l'ion (ici, 1 pour le sodium et les protons) ; F = constante de Faraday = 96 485,3329 s A mol^{-1})

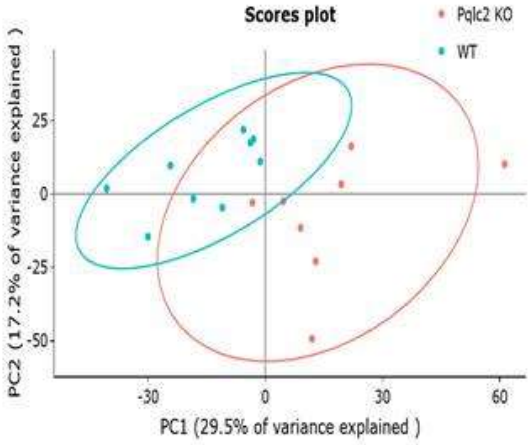
Ces trois tampons sont donc les suivants : (1) un tampon gluconate de sodium à pH6, qui atténue le gradient de protons et le gradient de sodium ; (2) un tampon sucrose à pH6, qui atténue le gradient de protons mais préserve le gradient de sodium ; (3) un tampon gluconate de sodium à pH7,4 qui inversement atténue le gradient de sodium mais préserve le gradient de protons.

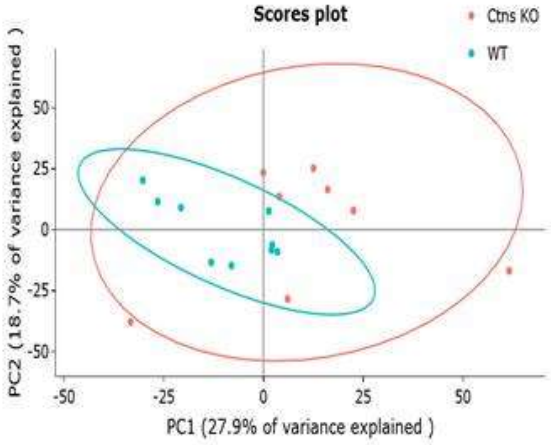


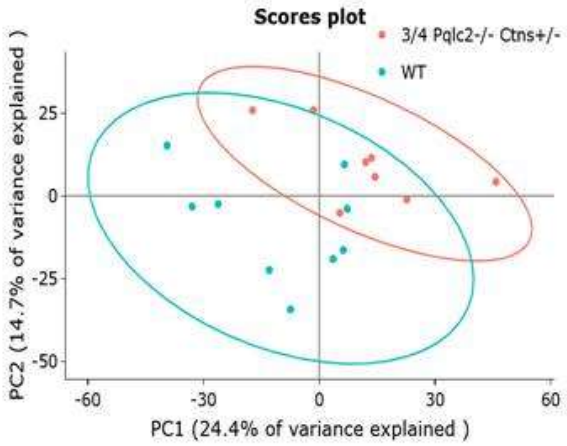
Annexe 12 : Absence d'effet de la modulation de canaux ioniques sur l'influx d'arginine dans les lysosomes. Influx d'arginine Cq-sensible en présence/absence de PI(3,5)P2 (activateur endogène des canaux TPC1/2 et TRPML1) + un activateur pharmacologique de TRPML1 (ML-SA1).

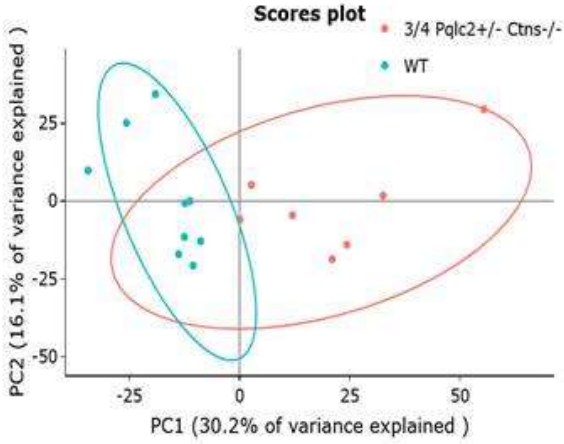


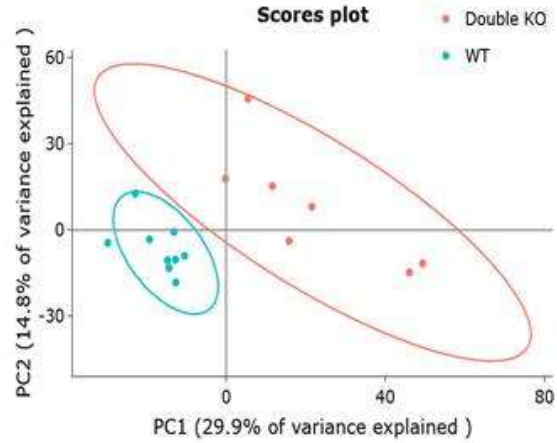
Annexe 13 : Localisation du fluide exocœlomique. Conceptus de rat au stade E11,5 (équivalent au stade E10 chez la souris). Le sac vitellin viscéral (vys) entoure complètement l'embryon (em) et est relié au cône ectoplacentaire (epc). On voit par transparence l'amnios (am), une autre membrane entourant l'embryon située à sa proximité immédiate. La cavité exocœlomique (eec) désigne l'espace situé entre le sac vitellin viscéral et l'amnios, et contient le fluide exocœlomique.
Adapté de Huxham & Beck, Development 1984 ; Barre d'échelle 1 mm











Annexe 14 : Score plots de l'analyse en composante principale du métabolomome exocœlomique d'embryons de souris au stade E10,5.

Analyse effectuée par nos collaborateurs des docteurs Florence Castelli et François Fenaille au CEA

Annexe 15 : Tableau représentant les taux de variation des métabolites (annotés dans la chimiothèque interne) de chaque génotype par rapport au sauvage, ainsi que la p value obtenue avec le test de Wilcoxon

name	annotation_spl_metaboname eunique	groupe1VSgroupe2_wilcoxo n_comp	groupe1VSgroupe2_wilcoxo n_foldchange	groupe1VSgroupe2_wilcoxo n_pvaluead justed-BH	groupe1VSgroupe3_wilcoxo n_comp	groupe1VSgroupe3_wilcoxo n_foldchange	groupe1VSgroupe3_wilcoxo n_pvaluead justed-BH	groupe1VSgroupe4_wilcoxo n_comp	groupe1VSgroupe4_wilcoxo n_foldchange	groupe1VSgroupe4_wilcoxo n_pvaluead justed-BH	groupe1VSgroupe5_wilcoxo n_comp	groupe1VSgroupe5_wilcoxo n_foldchange	groupe1VSgroupe5_wilcoxo n_pvaluead justed-BH	groupe1VSgroupe6_wilcoxo n_comp	groupe1VSgroupe6_wilcoxo n_foldchange	groupe1VSgroupe6_wilcoxo n_pvaluead justed-BH
M308T455	(-)-N-Acetylneuraminic acid	Pqlc2 KO-WT	0,89	0,3116	Ctns KO-WT	0,91	0,9245	3/4 Pqlc2+/- Ctns+/-WT	0,9	0,5837	3/4 Pqlc2+/- Ctns-/-WT	1	0,9605	Double KO Pqlc2/Ctns-WT	0,91	0,5396
M88T456_2	?-Alanine/Alanine/Sarcosine	Pqlc2 KO-WT	1,24	0,049	Ctns KO-WT	1,46	0,0197	3/4 Pqlc2-/- Ctns+/-WT	1,12	0,3508	3/4 Pqlc2+/- Ctns-/-WT	1,45	0,0439	Double KO Pqlc2/Ctns-WT	0,98	0,815
M1027504	?-aminobutyric acid /DL-3-Aminoisobutyric acid	Pqlc2 KO-WT	0,55	0,8143	Ctns KO-WT	0,84	0,9245	3/4 Pqlc2-/- Ctns+/-WT	0,46	0,888	3/4 Pqlc2+/- Ctns-/-WT	1,22	0,6305	Double KO Pqlc2/Ctns-WT	0,85	0,9131
M1457T518	?-Ketoglutaric acid	Pqlc2 KO-WT	1,18	1	Ctns KO-WT	1,66	0,2084	3/4 Pqlc2-/- Ctns+/-WT	1,16	0,9895	3/4 Pqlc2+/- Ctns-/-WT	1,71	0,0314	Double KO Pqlc2/Ctns-WT	2,06	0,1209
M333T537	?-Nicotinamide mononucleotide	Pqlc2 KO-WT	0,9	0,3544	Ctns KO-WT	1,01	0,888	3/4 Pqlc2-/- Ctns+/-WT	1,01	1	3/4 Pqlc2+/- Ctns-/-WT	1	0,9605	Double KO Pqlc2/Ctns-WT	0,88	0,3418
M163T329	1,5-Anhydro-D-sorbitol/L-Rhamnose	Pqlc2 KO-WT	1,57	0,0106	Ctns KO-WT	1,3	0,1814	3/4 Pqlc2-/- Ctns+/-WT	1,71	0,0034	3/4 Pqlc2+/- Ctns-/-WT	0,77	0,0222	Double KO Pqlc2/Ctns-WT	0,96	0,7023
M295T80_1	13(S)-Hydroxyoctadeca-9Z,11E-dienoic acid	Pqlc2 KO-WT	0,32	0,5	Ctns KO-WT	1,22	0,9594	3/4 Pqlc2-/- Ctns+/-WT	0,45	0,8462	3/4 Pqlc2+/- Ctns-/-WT	1,44	0,8334	Double KO Pqlc2/Ctns-WT	1,32	0,9649
M131T115	2-hydroxycaproic acid	Pqlc2 KO-WT	1,73	0,1754	Ctns KO-WT	1,79	0,1618	3/4 Pqlc2-/- Ctns+/-WT	1,36	0,281	3/4 Pqlc2+/- Ctns-/-WT	1,57	0,0439	Double KO Pqlc2/Ctns-WT	1,57	0,057
M115T121	2-Oxovaleric acid/Methyl acetoacetate	Pqlc2 KO-WT	0,72	0,2702	Ctns KO-WT	1,11	0,9594	3/4 Pqlc2-/- Ctns+/-WT	0,98	0,9895	3/4 Pqlc2+/- Ctns-/-WT	1,14	0,78	Double KO Pqlc2/Ctns-WT	1,02	0,9649
M117T138	3-Hydroxy 3-methylbutyric acid (?-Hydroxyisovaleric acid)/2	Pqlc2 KO-WT	1,38	0,049	Ctns KO-WT	1,69	0,0266	3/4 Pqlc2-/- Ctns+/-WT	1,35	0,0955	3/4 Pqlc2+/- Ctns-/-WT	1,94	0,0013	Double KO Pqlc2/Ctns-WT	1,92	0,0071
M137T152	3-Hydroxypicolinamide/2-Aminopyridine-3-carboxylic acid/	Pqlc2 KO-WT	0,57	0,3116	Ctns KO-WT	1,51	0,5405	3/4 Pqlc2-/- Ctns+/-WT	0,93	0,9639	3/4 Pqlc2+/- Ctns-/-WT	1,56	0,6305	Double KO Pqlc2/Ctns-WT	1,16	0,9131
M129T100	4-Methyl-2-oxovaleric acid/2-Ketohexanoic acid/3-Methyl-	Pqlc2 KO-WT	0,64	0,2337	Ctns KO-WT	1,12	0,81	3/4 Pqlc2-/- Ctns+/-WT	1,01	0,9895	3/4 Pqlc2+/- Ctns-/-WT	1,11	0,9174	Double KO Pqlc2/Ctns-WT	1,03	1
M134T199	Adenine	Pqlc2 KO-WT	0,87	0,9022	Ctns KO-WT	0,38	0,7268	3/4 Pqlc2-/- Ctns+/-WT	0,7	0,9086	3/4 Pqlc2+/- Ctns-/-WT	0,57	0,8334	Double KO Pqlc2/Ctns-WT	0,65	1
M151T378	Adonitol/L-(-)-Arabitol/D-(+)-Arabitol	Pqlc2 KO-WT	1,16	0,2702	Ctns KO-WT	1,07	0,6365	3/4 Pqlc2-/- Ctns+/-WT	1,02	0,9455	3/4 Pqlc2+/- Ctns-/-WT	1,17	0,1926	Double KO Pqlc2/Ctns-WT	1,04	0,9131
M157T458	Allantoin	Pqlc2 KO-WT	1	0,9802	Ctns KO-WT	1	1	3/4 Pqlc2-/- Ctns+/-WT	0,98	0,8177	3/4 Pqlc2+/- Ctns-/-WT	1,17	0,1577	Double KO Pqlc2/Ctns-WT	1,24	0,1209
M173T575_2	Arginine	Pqlc2 KO-WT	0,8	0,0041	Ctns KO-WT	0,85	0,2761	3/4 Pqlc2-/- Ctns+/-WT	0,82	0,0296	3/4 Pqlc2+/- Ctns-/-WT	0,38	0,0013	Double KO Pqlc2/Ctns-WT	0,38	0,0017
M173T621	Arginine	Pqlc2 KO-WT	0,82	0,025	Ctns KO-WT	0,89	0,2761	3/4 Pqlc2-/- Ctns+/-WT	0,85	0,0955	3/4 Pqlc2+/- Ctns-/-WT	0,38	0,0013	Double KO Pqlc2/Ctns-WT	0,38	0,0017
M131T447	Asparagine/3-Ureidopropionic acid	Pqlc2 KO-WT	0,92	0,6584	Ctns KO-WT	1,15	0,2761	3/4 Pqlc2-/- Ctns+/-WT	0,85	0,0955	3/4 Pqlc2+/- Ctns-/-WT	0,51	0,0013	Double KO Pqlc2/Ctns-WT	0,54	0,011
M121T130	Benzoic acid/4-Hydroxybenzaldehyde	Pqlc2 KO-WT	0,64	0,0388	Ctns KO-WT	0,98	1	3/4 Pqlc2-/- Ctns+/-WT	0,73	0,2458	3/4 Pqlc2+/- Ctns-/-WT	0,85	0,4637	Double KO Pqlc2/Ctns-WT	0,7	0,1466
M243T367	beta-Pseudouridine	Pqlc2 KO-WT	1,16	0,6584	Ctns KO-WT	0,98	0,81	3/4 Pqlc2-/- Ctns+/-WT	1,07	0,7356	3/4 Pqlc2+/- Ctns-/-WT	0,93	0,5167	Double KO Pqlc2/Ctns-WT	1,08	0,7634
M171T85	Capric acid	Pqlc2 KO-WT	0,55	0,1071	Ctns KO-WT	1,34	1	3/4 Pqlc2-/- Ctns+/-WT	0,73	0,434	3/4 Pqlc2+/- Ctns-/-WT	1,13	0,78	Double KO Pqlc2/Ctns-WT	1,16	1
M115T101	Caproic acid	Pqlc2 KO-WT	0,7	0,2702	Ctns KO-WT	1,01	0,888	3/4 Pqlc2-/- Ctns+/-WT	0,65	0,2065	3/4 Pqlc2+/- Ctns-/-WT	1,07	0,8842	Double KO Pqlc2/Ctns-WT	1,18	0,8672
M147T170	Cinnamic acid	Pqlc2 KO-WT	1,05	0,7637	Ctns KO-WT	1,14	0,8526	3/4 Pqlc2-/- Ctns+/-WT	1,03	0,8462	3/4 Pqlc2+/- Ctns-/-WT	0,69	0,0222	Double KO Pqlc2/Ctns-WT	0,65	0,057
M173T625	cis-Aconitic acid/Dehydroascorbic acid	Pqlc2 KO-WT	1,15	0,7637	Ctns KO-WT	1,04	0,9245	3/4 Pqlc2-/- Ctns+/-WT	1,2	0,434	3/4 Pqlc2+/- Ctns-/-WT	1,07	1	Double KO Pqlc2/Ctns-WT	1,24	0,5396
M129T510	Citraconic acid/Glutaconic acid/Itaconic acid /Mesaconic ac	Pqlc2 KO-WT	1,46	0,1512	Ctns KO-WT	1,66	0,0789	3/4 Pqlc2-/- Ctns+/-WT	1,33	0,0955	3/4 Pqlc2+/- Ctns-/-WT	1,91	0,0013	Double KO Pqlc2/Ctns-WT	2,56	0,0017
M191T586_2	Citric acid/Isocitric acid	Pqlc2 KO-WT	0,93	0,6584	Ctns KO-WT	0,95	0,9245	3/4 Pqlc2-/- Ctns+/-WT	0,98	0,9639	3/4 Pqlc2+/- Ctns-/-WT	1,06	0,5782	Double KO Pqlc2/Ctns-WT	1,05	0,7023
M130T456	Creatine	Pqlc2 KO-WT	1,16	0,0199	Ctns KO-WT	1,12	0,2761	3/4 Pqlc2-/- Ctns+/-WT	1,14	0,1712	3/4 Pqlc2+/- Ctns-/-WT	1,16	0,0314	Double KO Pqlc2/Ctns-WT	1,06	0,4897
M112T201	Creatinine	Pqlc2 KO-WT	1,29	0,025	Ctns KO-WT	1,22	0,2467	3/4 Pqlc2-/- Ctns+/-WT	1,38	0,059	3/4 Pqlc2+/- Ctns-/-WT	1,39	0,0023	Double KO Pqlc2/Ctns-WT	1,41	0,045
M147T510	D-a-Hydroxyglutaric acid (ou D-2-Hydroxyglutaric acid)	Pqlc2 KO-WT	1,45	0,1071	Ctns KO-WT	1,65	0,0789	3/4 Pqlc2-/- Ctns+/-WT	1,34	0,0955	3/4 Pqlc2+/- Ctns-/-WT	1,76	0,0013	Double KO Pqlc2/Ctns-WT	2,66	0,0017
M173T589	Dehydroascorbic acid/cis-Aconitic acid	Pqlc2 KO-WT	1,12	0,6019	Ctns KO-WT	1,04	0,9245	3/4 Pqlc2-/- Ctns+/-WT	1,16	0,6391	3/4 Pqlc2+/- Ctns-/-WT	0,99	0,6305	Double KO Pqlc2/Ctns-WT	1,18	0,5956
M227T167	Deoxyuridine/2?-Deoxyuridine,	Pqlc2 KO-WT	0,92	0,5512	Ctns KO-WT	1,15	0,772	3/4 Pqlc2-/- Ctns+/-WT	0,88	0,7356	3/4 Pqlc2+/- Ctns-/-WT	0,7	0,1291	Double KO Pqlc2/Ctns-WT	0,91	0,6493
M283T77	D-erythro-Dihydrosphingosine (Sphinganine)	Pqlc2 KO-WT	0,4	0,401	Ctns KO-WT	0,89	0,677	3/4 Pqlc2-/- Ctns+/-WT	0,49	0,9639	3/4 Pqlc2+/- Ctns-/-WT	0,4	0,6305	Double KO Pqlc2/Ctns-WT	0,39	0,815
M179T399	D-Fructose /L-(-)-Sorbose/D-Mannose/Glucose /D-Galactos	Pqlc2 KO-WT	1,18	0,9379	Ctns KO-WT	0,95	0,888	3/4 Pqlc2-/- Ctns+/-WT	0,89	0,8177	3/4 Pqlc2+/- Ctns-/-WT	1,74	0,0587	Double KO Pqlc2/Ctns-WT	2,06	0,2933
M193T535	D-Glucuronic acid/D-Galacturonic acid /D-(+)-Galacturonic	Pqlc2 KO-WT	0,63	0,0106	Ctns KO-WT	0,7	0,0789	3/4 Pqlc2-/- Ctns+/-WT	0,69	0,0458	3/4 Pqlc2+/- Ctns-/-WT	0,79	0,1577	Double KO Pqlc2/Ctns-WT	0,69	0,0956
M157T86	Diethyladipate/Nonanoic acid	Pqlc2 KO-WT	0,56	0,2029	Ctns KO-WT	1,39	1	3/4 Pqlc2-/- Ctns+/-WT	0,9	0,8462	3/4 Pqlc2+/- Ctns-/-WT	1,41	0,682	Double KO Pqlc2/Ctns-WT	1,28	0,9649
M133T533_2	Diglycolic acid /Pyruvic acid/Malic acid	Pqlc2 KO-WT	1,15	0,9802	Ctns KO-WT	1,04	0,772	3/4 Pqlc2-/- Ctns+/-WT	0,93	1	3/4 Pqlc2+/- Ctns-/-WT	1,31	0,308	Double KO Pqlc2/Ctns-WT	1,5	0,2118
M89T262	D-Lactic acid	Pqlc2 KO-WT	0,98	0,9802	Ctns KO-WT	0,95	0,888	3/4 Pqlc2-/- Ctns+/-WT	1,01	0,9086	3/4 Pqlc2+/- Ctns-/-WT	1,01	0,9174	Double KO Pqlc2/Ctns-WT	1,07	0,7634
M157T332	DL-Dihydroorotic acid	Pqlc2 KO-WT	2,5	0,1071	Ctns KO-WT	1,75	0,4902	3/4 Pqlc2-/- Ctns+/-WT	1,3	0,4808	3/4 Pqlc2+/- Ctns-/-WT	0,93	0,7336	Double KO Pqlc2/Ctns-WT	0,68	0,2933
M181T213	DL-p-Hydroxyphenyllactic acid/Homovanillic acid	Pqlc2 KO-WT	0,75	0,2029	Ctns KO-WT	0,96	0,4025	3/4 Pqlc2-/- Ctns+/-WT	0,66	0,0458	3/4 Pqlc2+/- Ctns-/-WT	0,9	0,6305	Double KO Pqlc2/Ctns-WT	0,93	0,7023
M203T233	DL-Tryptophan/L-Tryptophan	Pqlc2 KO-WT	1,35	0,025	Ctns KO-WT	1,13	1	3/4 Pqlc2-/- Ctns+/-WT	1,37	0,0362	3/4 Pqlc2+/- Ctns-/-WT	0,72	0,0439	Double KO Pqlc2/Ctns-WT	0,68	0,0162
M281T121	D-Sphingosine /Elaidic acid/trans-Vaccenic acid	Pqlc2 KO-WT	0,78	0,9022	Ctns KO-WT	0,88	0,9245	3/4 Pqlc2-/- Ctns+/-WT	0,43	0,9086	3/4 Pqlc2+/- Ctns-/-WT	1,04	0,9174	Double KO Pqlc2/Ctns-WT	1,5	1
M281T78	D-Sphingosine /Elaidic acid/trans-Vaccenic acid	Pqlc2 KO-WT	0,78	1	Ctns KO-WT	1,49	0,9245	3/4 Pqlc2-/- Ctns+/-WT	0,62	0,9455	3/4 Pqlc2+/- Ctns-/-WT	1	0,78	Double KO Pqlc2/Ctns-WT	2,07	0,7023
M147T211	Ethylmethylacetic acid (2-Methylbutyric acid)/Mevalonic ac	Pqlc2 KO-WT	0,96	0,9802	Ctns KO-WT	1,08	0,81	3/4 Pqlc2-/- Ctns+/-WT	0,98	0,9455	3/4 Pqlc2+/- Ctns-/-WT	0,99	0,9174	Double KO Pqlc2/Ctns-WT	0,83	0,1466
M279T78	gamma-Linolenic acid	Pqlc2 KO-WT	0,63	0,3116	Ctns KO-WT	0,79	0,5405	3/4 Pqlc2-/- Ctns+/-WT	0,99	0,3883	3/4 Pqlc2+/- Ctns-/-WT	0,71	0,5782	Double KO Pqlc2/Ctns-WT	0,91	0,8672
M195T458	Gluconic acid/Galactonic acid	Pqlc2 KO-WT	0,64	0,0316	Ctns KO-WT	0,7	0,2467	3/4 Pqlc2-/- Ctns+/-WT	0,65	0,0296	3/4 Pqlc2+/- Ctns-/-WT	0,68	0,1009	Double KO Pqlc2/Ctns-WT	0,63	0,075
M179T455	Glucose /D-Mannose/L-(-)-Sorbose/D-Galactose/Allose/D-F	Pqlc2 KO-WT	0,1	0,1071	Ctns KO-WT	0,73	0,888	3/4 Pqlc2-/- Ctns+/-WT	0,72	0,8462	3/4 Pqlc2+/- Ctns-/-WT	1,01	0,9605	Double KO Pqlc2/Ctns-WT	0,61	0,7023
M215T405	Glucose-6-PO4	Pqlc2 KO-WT	0,84	0,4519	Ctns KO-WT	1,07	0,9245	3/4 Pqlc2-/- Ctns+/-WT	0,95	0,9895	3/4 Pqlc2+/- Ctns-/-WT	0,95	0,9605	Double KO Pqlc2/Ctns-WT	0,79	0,3871
M171T504	Glycerol 3-phosphate	Pqlc2 KO-WT	1	0,9379	Ctns KO-WT	1,18	0,81	3/4 Pqlc2-/- Ctns+/-WT	1	0,888	3/4 Pqlc2+/- Ctns-/-WT	1,48	0,4637	Double KO Pqlc2/Ctns-WT	1,69	0,1209
M75T332	Glycolic acid	Pqlc2 KO-WT	1,09	0,3544	Ctns KO-WT	0,98	1	3/4 Pqlc2-/- Ctns+/-WT	1,31	0,0458	3/4 Pqlc2+/- Ctns-/-WT	1,03	0,7336	Double KO Pqlc2/Ctns-WT	1	0,9131
M116T492	Guanidineacetic acid	Pqlc2 KO-WT	1,26	0,7149	Ctns KO-WT	1,83	0,9917	3/4 Pqlc2-/- Ctns+/-WT	1,27	0,4808	3/4 Pqlc2+/- Ctns-/-WT	0,81	0,3561	Double KO Pqlc2/Ctns-WT	1,34	0,5956
M282T378	Guanosine	Pqlc2 KO-WT	0,89	0,8649	Ctns KO-WT	0,53	0,4466	3/4 Pqlc2-/- Ctns+/-WT	0,45	0,281	3/4 Pqlc2+/- Ctns-/-WT	0,62	0,682	Double KO Pqlc2/Ctns-WT	1,25	0,7634
M154T417_2	Histidine	Pqlc2 KO-WT	0,87	0,2029	Ctns KO-WT	0,88	0,2761	3/4 Pqlc2-/- Ctns+/-WT	0,83	0,0955	3/4 Pqlc2+/- Ctns-/-WT	0,43	0,0013	Double KO Pqlc2/Ctns-WT	0,54	0,057

M135T284	Hypoxanthine	Pqlc2 KO-WT	1,16	0,9802	Ctns KO-WT	0,68	0,589	3/4 Pqlc2-/- Ctns+/--WT	0,64	0,3508	3/4 Pqlc2+/- Ctns-/--WT	0,55	0,1291	Double KO Pqlc2/Ctns-WT	0,52	0,2118
M155T326	Imidazolelactic acid	Pqlc2 KO-WT	0,97	0,6584	Ctns KO-WT	1,46	0,1618	3/4 Pqlc2-/- Ctns+/--WT	0,98	0,8462	3/4 Pqlc2+/- Ctns-/--WT	1,72	0,0013	Double KO Pqlc2/Ctns-WT	1,72	0,0029
M204T164	Indolelactic acid/5-Methoxyindoleacetate/Cinnamoylglycin	Pqlc2 KO-WT	0,78	0,1277	Ctns KO-WT	0,67	0,1175	3/4 Pqlc2-/- Ctns+/--WT	0,53	0,0162	3/4 Pqlc2+/- Ctns-/--WT	0,94	0,7336	Double KO Pqlc2/Ctns-WT	1,55	0,057
M212T160	Indoxyl sulfate	Pqlc2 KO-WT	0,74	0,401	Ctns KO-WT	0,58	0,0141	3/4 Pqlc2-/- Ctns+/--WT	0,61	0,0296	3/4 Pqlc2+/- Ctns-/--WT	0,77	0,1291	Double KO Pqlc2/Ctns-WT	0,89	0,4897
M101T130	Isovaleric acid	Pqlc2 KO-WT	0,36	0,1277	Ctns KO-WT	1,67	0,9917	3/4 Pqlc2-/- Ctns+/--WT	0,72	0,7744	3/4 Pqlc2+/- Ctns-/--WT	0,43	0,3561	Double KO Pqlc2/Ctns-WT	1,31	1
M256T468	L-a-Glycerophosphorylcholine	Pqlc2 KO-WT	0,89	0,7637	Ctns KO-WT	1,42	0,1814	3/4 Pqlc2-/- Ctns+/--WT	1,14	0,9639	3/4 Pqlc2+/- Ctns-/--WT	2,3	0,0013	Double KO Pqlc2/Ctns-WT	2,79	0,0017
M132T553	L-Aspartic acid	Pqlc2 KO-WT	0,79	0,9353	Ctns KO-WT	1,28	0,9245	3/4 Pqlc2-/- Ctns+/--WT	0,84	0,9639	3/4 Pqlc2+/- Ctns-/--WT	1,21	0,7336	Double KO Pqlc2/Ctns-WT	0,9	1
M174T469	L-Citrulline	Pqlc2 KO-WT	1,09	0,7637	Ctns KO-WT	1,02	0,81	3/4 Pqlc2-/- Ctns+/--WT	1,04	0,9639	3/4 Pqlc2+/- Ctns-/--WT	1,09	0,5167	Double KO Pqlc2/Ctns-WT	1,13	0,7023
M200T574	L-Cysteine S-sulfate	Pqlc2 KO-WT	1,09	0,6584	Ctns KO-WT	0,95	0,81	3/4 Pqlc2-/- Ctns+/--WT	1,21	0,6897	3/4 Pqlc2+/- Ctns-/--WT	0,7	0,4637	Double KO Pqlc2/Ctns-WT	0,8	0,7634
M239T507	L-Cystine	Pqlc2 KO-WT	1,6	0,1071	Ctns KO-WT	1,14	0,8526	3/4 Pqlc2-/- Ctns+/--WT	1,17	0,7744	3/4 Pqlc2+/- Ctns-/--WT	1,66	1	Double KO Pqlc2/Ctns-WT	2,82	0,6493
M145T443_2	L-Glutamine/D-Glutamine	Pqlc2 KO-WT	0,92	0,4519	Ctns KO-WT	1,09	0,2761	3/4 Pqlc2-/- Ctns+/--WT	0,88	0,3121	3/4 Pqlc2+/- Ctns-/--WT	0,41	0,0013	Double KO Pqlc2/Ctns-WT	0,46	0,057
M207T189	L-Kynurenine	Pqlc2 KO-WT	1,28	0,0738	Ctns KO-WT	0,86	0,2761	3/4 Pqlc2-/- Ctns+/--WT	1,19	0,7744	3/4 Pqlc2+/- Ctns-/--WT	0,32	0,0013	Double KO Pqlc2/Ctns-WT	0,43	0,0329
M128T290	L-Pyroglutamic acid/D-Pyroglutamic acid (corrig?)	Pqlc2 KO-WT	1,1	0,5	Ctns KO-WT	1,3	0,677	3/4 Pqlc2-/- Ctns+/--WT	1,03	0,9086	3/4 Pqlc2+/- Ctns-/--WT	0,74	0,1926	Double KO Pqlc2/Ctns-WT	0,69	0,057
M135T422_2	L-Threonic acid	Pqlc2 KO-WT	1,66	0,0057	Ctns KO-WT	1,43	0,0372	3/4 Pqlc2-/- Ctns+/--WT	1,65	0,0081	3/4 Pqlc2+/- Ctns-/--WT	1,52	0,0104	Double KO Pqlc2/Ctns-WT	1,57	0,0329
M149T222	L-Xylulose/D-(-)-Ribose	Pqlc2 KO-WT	0,48	0,0604	Ctns KO-WT	0,6	0,1618	3/4 Pqlc2-/- Ctns+/--WT	0,46	0,0162	3/4 Pqlc2+/- Ctns-/--WT	0,27	0,0013	Double KO Pqlc2/Ctns-WT	0,23	0,0017
M145T549_2	Lysine	Pqlc2 KO-WT	0,78	0,0057	Ctns KO-WT	0,76	0,2761	3/4 Pqlc2-/- Ctns+/--WT	0,84	0,1403	3/4 Pqlc2+/- Ctns-/--WT	0,38	0,0013	Double KO Pqlc2/Ctns-WT	0,43	0,0047
M115T532	Maleic acid/Fumaric acid	Pqlc2 KO-WT	1,12	0,9022	Ctns KO-WT	1,02	0,9594	3/4 Pqlc2-/- Ctns+/--WT	0,9	0,9086	3/4 Pqlc2+/- Ctns-/--WT	1,23	0,4116	Double KO Pqlc2/Ctns-WT	1,39	0,2933
M103T531	Malonic acid	Pqlc2 KO-WT	0,76	0,1512	Ctns KO-WT	1,08	0,772	3/4 Pqlc2-/- Ctns+/--WT	0,94	0,9639	3/4 Pqlc2+/- Ctns-/--WT	1,03	0,4637	Double KO Pqlc2/Ctns-WT	1,06	0,5396
M129T588	Mesaconic acid/Itaconic acid /Glutaconic acid/Citraconic ac	Pqlc2 KO-WT	1,09	0,5512	Ctns KO-WT	1,03	0,9917	3/4 Pqlc2-/- Ctns+/--WT	1,15	0,5837	3/4 Pqlc2+/- Ctns-/--WT	0,99	0,682	Double KO Pqlc2/Ctns-WT	1,15	0,6493
M148T223	Methionine/S-ethyl-L-cysteine	Pqlc2 KO-WT	0,53	0,0388	Ctns KO-WT	0,63	0,1618	3/4 Pqlc2-/- Ctns+/--WT	0,52	0,0218	3/4 Pqlc2+/- Ctns-/--WT	0,31	0,0013	Double KO Pqlc2/Ctns-WT	0,27	0,0017
M117T510	Methylmalonic acid/Succinic acid /L-Threonic acid- 1,4-lacto	Pqlc2 KO-WT	1,81	0,7637	Ctns KO-WT	1	0,9594	3/4 Pqlc2-/- Ctns+/--WT	0,87	0,9086	3/4 Pqlc2+/- Ctns-/--WT	0,85	0,9174	Double KO Pqlc2/Ctns-WT	1,15	0,815
M250T450	Muramic acid	Pqlc2 KO-WT	0,09	0,1754	Ctns KO-WT	0,49	0,589	3/4 Pqlc2-/- Ctns+/--WT	0,69	0,8177	3/4 Pqlc2+/- Ctns-/--WT	0,33	0,4637	Double KO Pqlc2/Ctns-WT	0,11	0,2476
M179T550	Myo-inositol/Allose/D-Galactose	Pqlc2 KO-WT	0,92	0,6584	Ctns KO-WT	1,17	0,9594	3/4 Pqlc2-/- Ctns+/--WT	0,89	0,5837	3/4 Pqlc2+/- Ctns-/--WT	0,78	0,1926	Double KO Pqlc2/Ctns-WT	0,59	0,0329
M227T80	Myristic acid	Pqlc2 KO-WT	0,53	0,2029	Ctns KO-WT	0,84	0,6365	3/4 Pqlc2-/- Ctns+/--WT	0,76	0,6391	3/4 Pqlc2+/- Ctns-/--WT	1,32	0,308	Double KO Pqlc2/Ctns-WT	1,43	0,5956
M188T487	N acetyl DL glutamic acid/N-Acetyl-L-glutamic acid	Pqlc2 KO-WT	0,74	0,5512	Ctns KO-WT	0,87	0,8526	3/4 Pqlc2-/- Ctns+/--WT	1,04	0,9639	3/4 Pqlc2+/- Ctns-/--WT	0,71	0,5782	Double KO Pqlc2/Ctns-WT	0,38	0,045
M187T340	N6-Acetyl-L-lysine	Pqlc2 KO-WT	0,78	0,1071	Ctns KO-WT	0,73	0,0637	3/4 Pqlc2-/- Ctns+/--WT	1,31	0,9895	3/4 Pqlc2+/- Ctns-/--WT	0,74	0,0314	Double KO Pqlc2/Ctns-WT	0,88	0,3418
M303T554	N-Acetyl-Asp-Glu	Pqlc2 KO-WT	0,57	0,0316	Ctns KO-WT	0,54	0,0976	3/4 Pqlc2-/- Ctns+/--WT	0,59	0,1403	3/4 Pqlc2+/- Ctns-/--WT	0,77	0,7336	Double KO Pqlc2/Ctns-WT	0,45	0,0047
M172T175	N-Acetyl-D-allo-isoleucine/N-Acetyl-L-leucine /Hexanoyl gly	Pqlc2 KO-WT	0,13	0,8649	Ctns KO-WT	0,6	0,888	3/4 Pqlc2-/- Ctns+/--WT	0,54	0,8177	3/4 Pqlc2+/- Ctns-/--WT	0,52	0,8842	Double KO Pqlc2/Ctns-WT	0,57	0,9649
M146T322	N-Acetyl-DL-serine/O-Acetyl-L-serine	Pqlc2 KO-WT	0,87	0,0738	Ctns KO-WT	0,78	0,0372	3/4 Pqlc2-/- Ctns+/--WT	0,89	0,2458	3/4 Pqlc2+/- Ctns-/--WT	0,86	0,0774	Double KO Pqlc2/Ctns-WT	0,67	0,0017
M158T131	N-acetyl-DL-Valine/N-acetyl-DL-norvaline/N-Isovaleroylglyc	Pqlc2 KO-WT	0,73	0,049	Ctns KO-WT	1	0,2084	3/4 Pqlc2-/- Ctns+/--WT	1	0,9639	3/4 Pqlc2+/- Ctns-/--WT	0,92	0,9174	Double KO Pqlc2/Ctns-WT	0,7	0,1209
M130T221	N-Acetyl-L-alanine	Pqlc2 KO-WT	0,91	0,4519	Ctns KO-WT	0,86	0,589	3/4 Pqlc2-/- Ctns+/--WT	0,86	0,7744	3/4 Pqlc2+/- Ctns-/--WT	1,08	0,7336	Double KO Pqlc2/Ctns-WT	0,93	0,4376
M174T495	N-Acetyl-L-aspartic acid	Pqlc2 KO-WT	1,12	0,9379	Ctns KO-WT	0,78	0,772	3/4 Pqlc2-/- Ctns+/--WT	0,81	0,6897	3/4 Pqlc2+/- Ctns-/--WT	1,18	0,682	Double KO Pqlc2/Ctns-WT	1,24	0,3418
M190T133	N-Acetyl-L-methionine/N-Acetyl-D-penicillamine	Pqlc2 KO-WT	0,9	0,6019	Ctns KO-WT	0,79	0,2084	3/4 Pqlc2-/- Ctns+/--WT	0,86	0,7744	3/4 Pqlc2+/- Ctns-/--WT	0,9	0,5782	Double KO Pqlc2/Ctns-WT	0,81	0,2933
M173T367	N-Acetyl-ornithine	Pqlc2 KO-WT	1,13	0,401	Ctns KO-WT	1,04	0,888	3/4 Pqlc2-/- Ctns+/--WT	1,2	0,3883	3/4 Pqlc2+/- Ctns-/--WT	0,56	0,0104	Double KO Pqlc2/Ctns-WT	0,56	0,011
M121T133	Nicotinamide	Pqlc2 KO-WT	1,23	0,7637	Ctns KO-WT	0,62	0,4902	3/4 Pqlc2-/- Ctns+/--WT	0,88	0,7356	3/4 Pqlc2+/- Ctns-/--WT	0,77	0,5167	Double KO Pqlc2/Ctns-WT	0,8	0,5956
M144T155	N-Isobutyrylglycine/4-Acetamidobutanoic acid	Pqlc2 KO-WT	0,82	0,3544	Ctns KO-WT	0,97	0,3138	3/4 Pqlc2-/- Ctns+/--WT	0,95	0,8462	3/4 Pqlc2+/- Ctns-/--WT	0,99	0,8842	Double KO Pqlc2/Ctns-WT	0,82	0,4376
M146T504	N-Methyl-D-aspartic acid (NMDA)/L-Glutamic acid	Pqlc2 KO-WT	0,57	0,8649	Ctns KO-WT	0,84	0,9594	3/4 Pqlc2-/- Ctns+/--WT	0,48	0,9086	3/4 Pqlc2+/- Ctns-/--WT	1,2	0,6305	Double KO Pqlc2/Ctns-WT	0,86	0,8672
M143T90	Octanoic acid	Pqlc2 KO-WT	0,35	0,1071	Ctns KO-WT	1,18	0,81	3/4 Pqlc2-/- Ctns+/--WT	0,43	0,281	3/4 Pqlc2+/- Ctns-/--WT	1,01	1	Double KO Pqlc2/Ctns-WT	0,93	0,7634
M280T79_2	Oleamide	Pqlc2 KO-WT	1,15	0,9379	Ctns KO-WT	2,31	0,9245	3/4 Pqlc2-/- Ctns+/--WT	2,5	0,9086	3/4 Pqlc2+/- Ctns-/--WT	1,78	0,9174	Double KO Pqlc2/Ctns-WT	1,97	0,7634
M140T525_2	O-Phosphorylethanolamine	Pqlc2 KO-WT	0,41	0,8649	Ctns KO-WT	0,77	0,9917	3/4 Pqlc2-/- Ctns+/--WT	0,44	0,9455	3/4 Pqlc2+/- Ctns-/--WT	2,25	0,2288	Double KO Pqlc2/Ctns-WT	1,19	0,4376
M131T575	Ornithine	Pqlc2 KO-WT	0,77	0,0027	Ctns KO-WT	0,8	0,2761	3/4 Pqlc2-/- Ctns+/--WT	0,78	0,0051	3/4 Pqlc2+/- Ctns-/--WT	0,37	0,0013	Double KO Pqlc2/Ctns-WT	0,33	0,0017
M155T336	Orotic acid	Pqlc2 KO-WT	0,61	0,025	Ctns KO-WT	0,62	0,0637	3/4 Pqlc2-/- Ctns+/--WT	0,66	0,0955	3/4 Pqlc2+/- Ctns-/--WT	0,79	0,2288	Double KO Pqlc2/Ctns-WT	0,56	0,0071
M287T464	Orotidine	Pqlc2 KO-WT	0,91	0,4519	Ctns KO-WT	0,84	0,3138	3/4 Pqlc2-/- Ctns+/--WT	0,89	0,281	3/4 Pqlc2+/- Ctns-/--WT	0,88	0,268	Double KO Pqlc2/Ctns-WT	0,74	0,057
M89T610	Oxalic acid	Pqlc2 KO-WT	1,63	0,0388	Ctns KO-WT	1,62	0,1384	3/4 Pqlc2-/- Ctns+/--WT	2,08	0,0034	3/4 Pqlc2+/- Ctns-/--WT	2,4	0,0013	Double KO Pqlc2/Ctns-WT	2,41	0,0017
M218T204_2	Pantothenic acid	Pqlc2 KO-WT	1,42	0,1071	Ctns KO-WT	1,38	0,2084	3/4 Pqlc2-/- Ctns+/--WT	1,45	0,2458	3/4 Pqlc2+/- Ctns-/--WT	1,3	0,3561	Double KO Pqlc2/Ctns-WT	1,07	0,9131
M164T170_2	Phenylalanine/Benzocaine	Pqlc2 KO-WT	0,99	0,8143	Ctns KO-WT	1,12	0,81	3/4 Pqlc2-/- Ctns+/--WT	0,97	0,9895	3/4 Pqlc2+/- Ctns-/--WT	0,71	0,0222	Double KO Pqlc2/Ctns-WT	0,67	0,0956
M114T370_2	Proline	Pqlc2 KO-WT	0,92	0,3116	Ctns KO-WT	0,98	0,2761	3/4 Pqlc2-/- Ctns+/--WT	0,86	0,2458	3/4 Pqlc2+/- Ctns-/--WT	0,46	0,0013	Double KO Pqlc2/Ctns-WT	0,54	0,057
M166T507	Quinolinic acid	Pqlc2 KO-WT	0,93	0,9379	Ctns KO-WT	0,62	0,1384	3/4 Pqlc2-/- Ctns+/--WT	1,03	0,9895	3/4 Pqlc2+/- Ctns-/--WT	0,37	0,0013	Double KO Pqlc2/Ctns-WT	0,41	0,0029
M88T426	Sarcosine/?-Alanine/Alanine	Pqlc2 KO-WT	1,05	0,7149	Ctns KO-WT	1,05	0,2761	3/4 Pqlc2-/- Ctns+/--WT	0,9	0,3883	3/4 Pqlc2+/- Ctns-/--WT	0,52	0,0013	Double KO Pqlc2/Ctns-WT	0,57	0,0233
M104T455	Serine	Pqlc2 KO-WT	1	0,9802	Ctns KO-WT	1,49	0,3138	3/4 Pqlc2-/- Ctns+/--WT	0,9	0,3883	3/4 Pqlc2+/- Ctns-/--WT	0,57	0,0013	Double KO Pqlc2/Ctns-WT	0,58	0,045
M124T438_2	Taurine	Pqlc2 KO-WT	1,6	0,0604	Ctns KO-WT	1,43	0,2084	3/4 Pqlc2-/- Ctns+/--WT	1,77	0,0118	3/4 Pqlc2+/- Ctns-/--WT	1,29	0,268	Double KO Pqlc2/Ctns-WT	1,24	0,2476
M165T469	Terephthalic acid	Pqlc2 KO-WT	0,3	0,025	Ctns KO-WT	0,54	0,589	3/4 Pqlc2-/- Ctns+/--WT	0,42	0,281	3/4 Pqlc2+/- Ctns-/--WT	0,94	0,9174	Double KO Pqlc2/Ctns-WT	0,84	0,7023
M118T413	Threonine/D-allo-Threonine/L-Homoserine	Pqlc2 KO-WT	1,14	0,5512	Ctns KO-WT	1,1	0,7268	3/4 Pqlc2-/- Ctns+/--WT	1,01	0,888	3/4 Pqlc2+/- Ctns-/--WT	0,73	0,0587	Double KO Pqlc2/Ctns-WT	0,65	0,0162
M125T137	Thymine	Pqlc2 KO-WT	1,21	0,7637	Ctns KO-WT	0,79	0,4902	3/4 Pqlc2-/- Ctns+/--WT	0,76	0,3883	3/4 Pqlc2+/- Ctns-/--WT	0,52	0,1291	Double KO Pqlc2/Ctns-WT	0,65	0,2118
M130T463	trans-4-hydroxy-L-proline/cis-4-hydroxy-D-proline/trans-3-H	Pqlc2 KO-WT	0,81	0,0902	Ctns KO-WT	0,79	0,2761	3/4 Pqlc2-/- Ctns+/--WT	0,7	0,059	3/4 Pqlc2+/- Ctns-/--WT	0,55	0,0066	Double KO Pqlc2/Ctns-WT	0,52	0,0071
M136T312	Trigonelline/4-Aminobenzoic acid/2-Aminobenzoic acid	Pqlc2 KO-WT	1,06	0,9379	Ctns KO-WT	1,03	0,772	3/4 Pqlc2-/- Ctns+/--WT	1,08	0,8177	3/4 Pqlc2+/- Ctns-/--WT	1,14	0,8334	Double KO Pqlc2/Ctns-WT	1,44	0,2933
M180T325	Tyrosine/3-Amino-3-(4-hydroxyphenyl)propanoic	Pqlc2 KO-WT	0,98	0,8143	Ctns KO-WT	1,17	0,589	3/4 Pqlc2-/- Ctns+/--WT	0,95	0,8177	3/4 Pqlc2+/- Ctns-/--WT	0,68	0,0042	Double KO Pqlc2/Ctns-WT	0,64	0,057
M111T178_1	Uracil	Pqlc2 KO-WT	1,24	0,9802	Ctns KO-WT	0,97	0,81	3/4 Pqlc2-/- Ctns+/--WT	0,85	0,6897	3/4 Pqlc2+/- Ctns-/--WT	0,6	0,1009	Double KO Pqlc2/Ctns-WT	0,85	0,815
M134T348	Urethane (Ethyl carbamate)	Pqlc2 KO-WT	4,6	0,0027	Ctns KO-WT	2,52	0,0789	3/4 Pqlc2-/- Ctns+/--WT	3,4	0,0162	3/4 Pqlc2+/- Ctns-/--WT	2,76	0,1009	Double KO Pqlc2/Ctns-WT	2,47	0,0329
M116T293	Valine	Pqlc2 KO-WT	0,87	0,0902	Ctns KO-WT	0,94	0,2761	3/4 Pqlc2-/- Ctns+/--WT	0,87	0,0955	3/4 Pqlc2+/- Ctns-/--WT	0,55	0,0013	Double KO Pqlc2/Ctns-WT	0,58	0,011
M151T357	Xanthine	Pqlc2 KO-WT	2,01	0,9022	Ctns KO-WT	1,08	0,9245	3/4 Pqlc2-/- Ctns+/--WT	0,67	0,5332	3/4 Pqlc2+/- Ctns-/--WT	0,81	0,8334	Double KO Pqlc2/Ctns-WT	1,49	0,7634

Test	Souris (âge = 43 jours)		
	65 (DKO)	66 (*Pqlc2* KO)	67 (*Pqlc2* KO)
Wire hang	1'35''	27''	44''
Open field (5 min)	cent. 18'' peri. 4'42''	cent. 2'20'' peri. 2'40''	cent. 3'20'' peri. 1'40''
Rotarod	2'52''	1'38''	1'59''

	Critère SHIRPA (0 = non ; 1 = oui)	Souris (âge = 43 jours)		
		65 (DKO)	66 (*Pqlc2* KO)	67 (*Pqlc2* KO)
Taille	Taille	7,0	8,5	8,2
	Long. Queue	6,6	7,0	7,3
Comport. basal	Repos	1	1	1
	Redressements	1	1	1
	Reniflements	1	1	1
	Creuse litière	0	1	1
	Saut	0	0	0
	Course	0	0	0
	Toilette	1	0	0
Comport. cage inconnue	Redressements	1	1	1
	Reniflements	1	1	1
	Explore cage	1	1	1
	Immobilisation	1	1	1
	Toilette	1	1	1
	Saut	0	0	0
	Course	0	0	0
	Défécation	1	0	1
	Urine	0	1	0
Morpho.	Yeux	0	1	1
	Vibrisses	1	1	1
	Pelage	1	1	1
Réflexes	Réflexe yeux	1	1	1
	Réflexe oreilles	1	1	1
	Réflexe vibrisses	1	1	1
	Réponse bascule	1	1	1
	Suspension	1	1	1

Annexe 16 : résultats des tests de Wire Hang, Open Field, Rotarod et SHIRPA menés sur la souris DKO (#65) et les deux souris contrôle *Pqlc2* KO (#66 et #67).

Résumé :

Les lysosomes jouent plusieurs rôles majeurs dans l'homéostasie cellulaire allant du recyclage des composants des macromolécules à l'intégration de processus de signalisation cellulaire. Des défauts de ces organites sont impliqués dans diverses pathologies, dont la cystinose, une maladie rare causée par l'inactivation de la cystinosine, le transporteur lysosomal de cystine. Mon laboratoire d'accueil a montré que la pharmacothérapie de la cystinose par la cystéamine requiert l'activité d'un autre transporteur lysosomal d'acides aminés : PQLC2. Ils ont par la suite produit une lignée de souris déficiente en PQLC2 et découvert que la perte concomitante des deux transporteurs induit une létalité synthétique embryonnaire chez la souris, en contraste avec la viabilité des knock-out (KO) individuels de ces gènes. L'objectif de ma thèse était de comprendre comment les deux transporteurs lysosomaux d'acides aminés interagissent et pourquoi cette interaction est nécessaire au développement embryonnaire. Mes résultats montrent que les embryons doublement KO (DKO) possèdent une taille réduite et une dysmorphie céphalique sévère dès 10 jours de développement. J'ai ensuite identifié les cellules endodermales du sac vitellin viscéral, un épithélium extra-embryonnaire assurant la nutrition de l'embryon avant la mise en place du placenta, comme un lieu majeur de l'interaction génétique entre les deux transporteurs. Cette interaction se manifeste par une dilatation des compartiments endolysosomaux de ces cellules chez chacun des simples KO, qui s'accroit de manière spectaculaire chez le DKO. Des analyses microscopiques et fonctionnelles des sacs vitellins conjuguées à une analyse métabolomique du fluide exocoelomique contenu dans les sacs montrent que ces défauts s'accompagnent d'une altération sévère de la fonction histiotrophique de ce tissu. Ces travaux permettent de proposer un modèle biochimique de l'interaction fonctionnelle entre les deux transporteurs, ainsi que le rôle de cette interaction dans le développement et la cause probable de la létalité embryonnaire chez le DKO.

Abstract:

Lysosomes play key roles in cell homeostasis ranging from the degradation and recycling of macromolecules to the integration of intracellular signaling pathways. Defects in these organelles underlie diverse pathologies, including cystinosis, a rare genetic disease caused by inactivation of cystinosin, the lysosomal cystine transporter. My host laboratory showed that treatment of cystinosis patients with cysteamine requires another lysosomal amino acid transporter, termed PQLC2. They produced a mouse line constitutively defective for PQLC2 and crossed it with the mouse model of cystinosis. Surprisingly, dual loss of cystinosin and PQLC2 caused synthetic embryonic lethality, in contrast with the viability and progressive phenotypes of individual gene knockouts (KO). The aim of my PhD project was to understand how the two lysosomal amino acid transporters interact and why this interaction is necessary for embryonic development. My results show that doubly KO (DKO) embryos have a reduced size and severe brain defects after 10 days of development. I also identified endodermal cells of the visceral yolk sac – an extraembryonic epithelium ensuring embryo nutrition before the onset of placental function - as a major site for the functional interaction between the two transporters. This interaction is associated with endolysosomal enlargement in single KO cells, which dramatically increases in DKO cells. Microscopic and functional analyses of KO and/or DKO yolk sacs combined with metabolomic analysis of their exocoelomic fluid content revealed that the lysosomal defects are accompanied by severe impairment of the histiotrophic function. Overall, these results suggest a biochemical model for the functional interaction between the two transporters as well as a role for this interaction during mammalian embryo development, including the probable cause of DKO embryo lethality.