



HAL
open science

Étude mécanistique et physiologique du transporteur lysosomal d'acides aminés PQLC2

Xavier Leray

► **To cite this version:**

Xavier Leray. Étude mécanistique et physiologique du transporteur lysosomal d'acides aminés PQLC2. Biologie moléculaire. Université Sorbonne Paris Cité, 2016. Français. ⟨NNT : 2016USPCB152⟩. ⟨tel-04474507⟩

HAL Id: tel-04474507

<https://theses.hal.science/tel-04474507v1>

Submitted on 23 Feb 2024

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

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



HAL Authorization

Université Paris Descartes

Ecole doctorale N°563

MTCI : Médicament, Toxicologie, Chimie, Imageries

Laboratoire de Neurophotonique / Equipe Transporteur Membranaire

Etude mécanistique et physiologique du transporteur lysosomal d'acides aminés PQLC2

Par Xavier Leray

Thèse de doctorat de Biologie, médecine et santé

Dirigée par Bruno Gasnier

Présentée et soutenue publiquement le lundi 7 novembre 2016

Devant un jury composé de :

le Maire Marc	Professeur émérite, Université Paris-Saclay	Président
Supplisson Stéphane	Directeur de recherche, ENS Paris	Rapporteur
André Bruno	Professeur, Université libre de Bruxelles	Rapporteur
Krejci Eric	Directeur de recherche, Université Paris Descartes	Examineur
Gasnier Bruno	Directeur de recherche, Université Paris Descartes	Directeur de thèse

Table des matières

REMERCIEMENTS.....	8
ABREVIATIONS	10
PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS DE LA THESE	12
INTRODUCTION.....	14
1. Le lysosome	14
1.1. Généralités.....	14
<i>Découvertes et grandes fonctions.....</i>	<i>14</i>
<i>Rôle dans la nutrition cellulaire</i>	<i>15</i>
<i>Rôle dans la mort cellulaire programmée.....</i>	<i>15</i>
<i>Rôle dans la réponse au stress oxydant</i>	<i>16</i>
1.2. Le lysosome comme usine de maintenance et de recyclage	16
<i>Import du matériel à dégrader et recycler.....</i>	<i>17</i>
<i>Recyclage en matière première</i>	<i>18</i>
<i>Export de la matière première</i>	<i>18</i>
<i>Maladies de stockage lysosomal.....</i>	<i>18</i>
<i>Diversité des rôles cellulaires de la dégradation lysosomale.....</i>	<i>19</i>
1.3. Le lysosome comme plateforme de signalisation.....	19
<i>mTORC1 est activé à la surface du lysosome</i>	<i>19</i>
<i>Zoom sur le transcepteur SLC38A9</i>	<i>22</i>
<i>Existence d'un mécanisme de rétrocontrôle transcriptionnel adaptant la biogénèse lysosomale aux besoins dégradatifs de la cellule</i>	<i>24</i>
2. PQLC2, le transporteur lysosomal d'acides aminés cationiques	26
2.1. Généralités sur les transporteurs secondaires.....	26
<i>Le concept d'accès alterné</i>	<i>26</i>
<i>Les différents modèles structuraux d'accès alterné.....</i>	<i>28</i>
<i>Concepts de trans-stimulation et de trans-inhibition</i>	<i>30</i>
2.2. Le transporteur lysosomal PQLC2.....	32
<i>Premières descriptions biochimiques : le « système c » de transport lysosomal d'acides aminés.....</i>	<i>32</i>

<i>Identification de PQLC2</i>	33
<i>La superfamille structurale « SWEET/PQ-loop »</i>	36
<i>Propriétés de transport de PQLC2</i>	39
2.3. Implication dans le traitement de la cystinose	40
<i>La cystinose : généralités</i>	40
<i>Le traitement à la cystéamine et PQLC2</i>	41
<i>Le modèle murin de la cystinose</i>	43
METHODES	45
1. Potentiel imposé à deux électrodes sur ovocyte de Xénope	45
1.1. Préparation des ovocytes de Xénope	45
1.2. Principe du potentiel imposé à deux électrodes.....	46
1.3. Solutions et molécules utilisées	47
1.4. Protocole de détermination du ratio charge-substrat.....	48
1.5. Protocole d'étude du couplage de PQLC2 aux protons	48
1.6. Protocole de sauts de potentiel	49
1.7. Solutions spécifiques de l'étude du couplage de PQLC2 aux ions Na ⁺ , K ⁺ , H ⁺ et Cl ⁻	50
2. Patch-clamp sur HEK293T	50
2.1. Préparation des cellules HEK293T	50
2.2. Expériences de patch-clamp en configuration « cellule entière ».....	51
2.3. Protocole de rampe de potentiels.....	53
2.4. Protocole appliqué à une cellule venant d'être patchée	53
3. Modèles murins	55
3.1. Souris utilisées	55
3.2. Construction des souris chimériques.....	56
3.3. Amorces utilisées pour la validation de l'inactivation du gène Pqlc2.	57
3.4. Protocole d'analyse des ARNm de Pqlc2.....	57
3.5. Protocole de prélèvement et d'analyse du contenu en métabolites du plasma sanguin suite à un jeûne alimentaire.....	58
3.6. Modèles de transmission génétique utilisés	58
CHAPITRE 1 : ETUDE MECANISTIQUE DE PQLC2	60
1. Etude du couplage ionique de PQLC2 : approche par mesure de flux	60
1.1. Mesure du rapport charge-substrat de PQLC2	60

1.2.	Etude du couplage de PQLC2 aux protons	62
2.	La dépendance au potentiel de PQLC2 est inhabituelle aux potentiels positifs	64
2.1.	Mise en évidence du phénomène de « courant paradoxal ».....	64
2.2.	Le courant paradoxal dépend de l'« histoire » de l'ovocyte	66
2.3.	Le courant paradoxal est un artefact de soustraction dû à la suppression du courant d'efflux par l'arginine externe	68
3.	Le courant d'efflux d'acides aminés cationiques internes est rendu silencieux par l'arginine externe, mais pas par la lysine.....	71
3.1.	Etude de la dépendance au potentiel du transport de lysine	71
3.2.	La mise sous silence de l'efflux dépend exclusivement de l'arginine externe.....	73
4.	Mise en évidence d'un courant paradoxal induit par les acides aminés cationiques endogènes	76
5.	Etude de la dépendance au potentiel de PQLC2 par la méthode de patch clamp sur cellules HEK293T	78
5.1.	Les dépendances au potentiel du transport de lysine et d'arginine sont identiques en condition zéro-trans.....	78
5.2.	L'ajout d'acides aminés cationiques dans le compartiment cytosolique reproduit les résultats obtenus sur ovocytes de Xénopes	80
5.3.	La mise sous silence de l'efflux d'acides aminés cationiques internes est propre à l'arginine externe : étude de la dépendance au potentiel de l'histidine	83
6.	Etude du couplage ionique de PQLC2 : approche thermodynamique par mesure du potentiel d'inversion.....	85
6.1.	Méthode de détermination du couplage ionique par l'étude des potentiels d'inversion.....	85
6.2.	Détermination du nombre de charge(s) couplée(s) au substrat par mesure du potentiel d'inversion.....	86
6.3.	PQLC2 n'est pas couplé aux ions Na ⁺ , K ⁺ , H ⁺ et Cl ⁻	88
7.	Symétrie fonctionnelle de l'effet de mise sous silence par l'arginine	93
7.1.	Protocole	93
7.2.	Résultats	93
8.	Conclusions et perspectives.....	95
8.1.	Hypothèse de travail.....	95

8.2. Perspectives	98
-------------------------	----

CHAPITRE 2 : ROLE PHYSIOLOGIQUE DE PQLC2101

1. Le modèle murin <i>Pqlc2</i> -/-	102
1.1. Production du modèle murin <i>Pqlc2</i> -/-	102
<i>Production des souris chimériques porteuses de la mutation pour <i>Pqlc2</i></i>	<i>102</i>
<i>Production des souris <i>Pqlc2</i> hétérozygotes sur fond génétique C57BL/6N</i>	<i>103</i>
1.2. Validation de l'inactivation du gène <i>Pqlc2</i>	105
<i>Caractérisation de l'allèle muté</i>	<i>105</i>
<i>Analyse des transcrits</i>	<i>108</i>
<i>Conséquence attendue au niveau protéique</i>	<i>108</i>
1.3. Viabilité et croissances des souris KO <i>Pqlc2</i>	109
<i>Transmission génétique de la mutation.....</i>	<i>109</i>
<i>Croissance et viabilité post-natale</i>	<i>110</i>
1.4. Analyse histologique, cellulaire et subcellulaire.....	112
<i>Le foie.....</i>	<i>113</i>
<i>La rate</i>	<i>115</i>
<i>Le muscle squelettique.....</i>	<i>115</i>
<i>Le cervelet</i>	<i>115</i>
<i>Etude préliminaire de la rétine.....</i>	<i>120</i>
<i>Conclusion générale de l'étude histologique</i>	<i>121</i>
1.5. Etude de l'impact d'un jeûne alimentaire sur le contenu en métabolites du plasma sanguin	121
<i>Résultats.....</i>	<i>122</i>
2. Mise en évidence d'une interaction génétique entre PQLC2 et la cystinosine	128
2.1. Motivation de ces travaux.....	128
2.2. Stratégie de génotypage	128
2.3. Essai de production du double KO <i>Pqlc2</i> - <i>Ctns</i> et analyse génotypique des croisements	129
<i>Le génotype double KO est associé à une létalité synthétique prénatale ou périnatale</i>	<i>129</i>
<i>Analyse de l'interaction génétique de PQLC2 et de la cystinosine en fonction du sexe .</i>	<i>131</i>
<i>Il existe un « effet dosage » du nombre d'allèles mutés.....</i>	<i>131</i>
2.4. Confirmation du phénotype de létalité synthétique	133
<i>Croisements asymétriques</i>	<i>133</i>
<i>Croisements symétriques</i>	<i>135</i>

<i>Conclusion sur les croisements simplifiés</i>	136
2.5. Preuve directe du stade embryonnaire de la létalité synthétique.....	136
2.6. La létalité synthétique est-elle due à l'activité de transport des deux protéines lysosomales ?	138
<i>Principe de l'expérience</i>	138
<i>Résultats</i>	138
2.7. Interprétation des résultats obtenus	140
<i>Hypothèse de convergence biochimique des fonctions moléculaires de PQLC2 et de la cystinosine</i>	140
<i>Hypothèse sur l'origine de la létalité embryonnaire</i>	143
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	145
1. Rôle possible de PQLC2 dans la modulation de la voie mTOR.....	145
2. Rôle possible de PQLC2 dans la constitution et l'utilisation de stocks d'arginine intralysosomal	148
RÉFÉRENCES	151
RESUME – ABSTRACT	161

Je tiens à remercier chaleureusement la Cystinosis Research Foundation (CRF) qui a financé mes quatre années de thèses. J'espère que ces travaux apporteront leur lot d'informations utiles à la communauté scientifique pour améliorer le traitement de la cystinose et la qualité de vie des personnes cystinotiques. Je souhaite de tout cœur qu'un jour cette maladie soit guérie et je suis confiant dans la capacité et le dévouement des communautés comme la CRF, à atteindre, un jour, cet objectif.

I would like to warmly thank the Cystinosis Research Foundation (CRF) for the financial support of my four years of PhD thesis. I hope that the information obtained during this work will be useful for the research community to find a better treatment and to improve the quality of life for those with cystinosis. Finally, I sincerely hope that, one day, cystinosis will never more be a problem, and I trust that CRF will ultimately reach this goal.

Remerciements

Dans mon cas, la thèse est l'aboutissement d'un long processus permis par la rencontre d'enseignants et de chercheurs, de l'école primaire à la thèse, qui ont su me donner l'envie d'en savoir toujours plus sur le monde qui nous entoure. Je les remercie tous du fond du cœur, et je suis persuadé que, sans leur rencontre, je n'aurais jamais eu la chance d'écrire ces lignes.

Je tiens à remercier mes parents, qui ont su me transmettre leur curiosité et le plaisir d'apprendre, et qui m'ont offert un cadre de vie propice à mon épanouissement personnel. Je les remercie également d'avoir su faire preuve de patience, et de m'avoir fait confiance et soutenu dans mes choix.

Je remercie également Sophie, qui, pour une personne qui se dit ne pas être patiente, a su tenir le coup face à ces quatre années originales et intenses. Je la remercie d'avoir accepté, peut-être aussi sous la contrainte de l'unique pièce de vie de notre studio, de sacrifier quelques nuits pour mes réflexions scientifiques personnelles. Enfin, je tiens à la remercier de m'avoir supporté (dans tous les sens du terme), malgré mon don inné pour l'organisation, et mon humour sans faille. On fait une sacré équipe !

Je remercie la Cystinosis research Foundation de nous avoir fait confiance en finançant mes 4 années de thèses.

Je tiens à remercier Marc le Maire, Stéphane Supplisson, Bruno André et Eric Krejci d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse. Je pensais naïvement que la constitution d'un jury de thèse allait de soi, mais j'ai maintenant conscience du travail et du sens que cela représente.

Je remercie également nos différents collaborateurs, Anselm A. Zdebick, Bernadette Chadeaux-Vekemans, Jöelle Aupetit, Corinne Antignac, Bruno Saubaméa, Virginie Mignon, Marc Abitbol, Françoise Gilard, François Fenaille, Joanne Xie, Philippe Ascher, et JacSue Kehoe, qui font partie intégrante de cette aventure, pour leur aide et leurs participations à mes différents projets.

Je remercie l'équipe de l'animalerie des Saints-Pères avec qui cela fut un réel plaisir de travailler.

Merci aux membres du laboratoire, François Darchen, Isabelle Fanget, Claire Desnos, Solène Lebrun, Damien Carrel, Dany Khamsing avec qui j'ai pu échanger et partager beaucoup de choses, autant scientifique que culinaire.

Je tiens à remercier plus particulièrement Cécile Jouffrey et Christopher Ribes pour leur aide dans la plupart des expériences que j'ai réalisé durant ma thèse. Un grand merci à Christine Anne et Seana O'Regan pour leur soutien, leur aide précieuse, leur bons conseils et leur tolérance (je siffle beaucoup et on partage le même « box »). J'ai vraiment apprécié de travailler avec vous ! Un grand merci aussi à Corinne Sagné et Quentin Verdon, qui ont également dû supporter mes sifflements (ils

sont situés dans le « box » d'à côté), et qui étaient toujours présents quand j'avais besoin de conseils. Un petit clin d'œil à Quentin avec qui j'ai pu piller la majorité des pâtisseries du 6^{ème} arrondissement. Et un « bonne chance ! » à Yann qui prend la suite de l'aventure PQLC2. Je n'aurais pas pu rêver à meilleure personne pour prendre le relais !

Enfin, je tiens vraiment à remercier Bruno Gasnier, mon directeur de thèse, avec qui j'ai vraiment énormément appris durant ces quatre années. Je venais d'un parcours de neurosciences, et je ne savais pas si le monde des lysosomes et des transporteurs allaient me plaire. Maintenant, je n'échangerais cette expérience pour rien au monde ! Merci à toi de m'avoir fait confiance et de m'avoir laissé le temps de m'approprier le sujet et les approches. Merci pour ta disponibilité, ton écoute et ton partage. Je me sens vraiment chanceux d'avoir pu effectuer ma thèse sous ta direction !

Longue vie à cette équipe incroyable, et bonne chance à tous pour la suite !

Abréviations

+/+ : génotype sauvage

+/- : génotype hétérozygote

-/- : génotype homozygote (KO)

3-mut : génotype homozygote pour un gène et hétérozygote pour le second

ARNm/ARNc : Acide RiboNucléique messenger/complémentaire

ATP : Adénosine TriPhosphate

BCECF : acide (2',7'-Bis-(2-CarboxyEthyle)-5-(Et-6)-CarboxyFluorescéine)

C-terminale : Carboxy-terminale

C57BL/6 : lignée murine C57 Black / 6

CAA : Acides Aminés Cationiques

CLEAR : Coordinated Lysosomal Expression and Regulation

CRF : Cystinosis Research Foundation

EGFP : Enhanced Green Fluorescent Protein

ES : cellules Souches Embryonnaires

GC/MS-TOF : Chromatographie en phase Gaseuse / Spectrométrie de Masse par Temps de vol (Time Of Flight)

GEF : Facteur d'Echange nucléotidique de Guanine

GCN2 : General Control Nonderepressible 2

GSH : Glutathion

GTPases : enzymes de la Guanosine Trois-Phosphates

HEK : Human Embryonic Kidney

HEPES : acide 4-(2-HydroxyEthyl)-1-Pipérazine Ethane Sulfonique

KO : Knock-Out (délété)

LAAT-1 : Transporter d'Acides Aminés 1

LDL : Lipoprotéines de faible (Light) Densité

LSD : maladie (Disease) de Stockage Lysosomal

MES : acide 2-(N-Morpholino) éthane sulfonique

mTOR : mammalian Target Of Rapamycin

mTORC1 : mammalian Target Of Rapamycin Complex 1

MxD : Disulfure Mixte de cysteine-cystéamine

N-terminale : NH₂-terminal (amine)

NMDG : N-Méthyle-D-glucamine

NO : Oxyde Nitrique

PC : lignée murine mutée pour *Ctns* et *Pqlc2*

PCR : technique de Réaction en Chaîne par une Polymérase

PQLC2 : PQ-loop repeat containing 2

ROS : espèces (Species) Réactives de l'Oxygène

SPQ : SWEET]-[PQ-loop)

Système « c » : système « cationique »

TEVC : potential (Voltage) imposé (Clamp) à deux (Two) Electrodes

THB : faisceau (Bundle) de Trois Hélices

TM : TransMembranaire

TFEB : Facteur de transcription « EB »

V-ATPases : pompe Vésiculaire de protons

WT : « Wild type », Sauvage

Problématique et objectifs de la thèse

Au moment où je suis arrivé dans mon équipe d'accueil, à la fin de l'année 2012, celle-ci était sur le point de publier l'article princeps rapportant l'identification du transporteur lysosomal d'acides aminés cationiques PQLC2 (Jézégou *et al.*, 2012).

Cette découverte, réalisée de manière indépendante et concomitante par un autre groupe du « National Institute of Biological Sciences » de Pékin (Liu *et al.*, 2012), permettait également de combler un vide sur le mode d'action d'un médicament, la cystéamine, dans le traitement d'une maladie de stockage lysosomale, la cystinose. Ces deux études faisaient donc deux percées scientifiques importantes : l'identification d'un nouvel acteur de la biologie lysosomale, et la découverte du mécanisme d'action d'un médicament.

Mon sujet d'étude faisait ainsi écho à ces nouveautés, avec deux axes de recherche menant à **3 principaux objectifs** :

- 1) terminer la caractérisation fonctionnelle de PQLC2
- 2) évaluer la généralité, ou non, du mode d'action de la cystéamine, montré *ex-vivo* sur des fibroblastes, à l'échelle de l'organisme par la production d'un modèle murin dépourvu de PQLC2 (KO)
- 3) utiliser ce modèle KO pour aborder l'étude du rôle physiologique de PQLC2 chez la souris, comme nos concurrents l'avaient fait chez le nématode.

L'activité de transport de PQLC2 avait été bien caractérisée dans l'étude de mon équipe d'accueil, mais plusieurs questions importantes avaient été laissées en suspens. Notamment, elle n'avait pas permis de caractériser son couplage ionique, c'est-à-dire la source d'énergie qu'il utilise pour transporter ses substrats à travers la membrane du lysosome. Les outils nécessaires pour étudier cette question étant présents dans mon laboratoire, mes premiers travaux s'y étaient donc naturellement consacrés.

Mes premiers résultats indiquaient, sans ambiguïté, un couplage ionique du transport indépendant des protons, la principale source d'énergie utilisée par les transporteurs du lysosome. En revanche, les premières études des paramètres cinétiques de l'activité de transport de PQLC2 mettaient à jour un comportement dont l'origine, malgré nos efforts, nous échappait. Ce n'est qu'après plus de deux années de recherche que, suite à l'accumulation d'un nombre suffisant de pièces de puzzle, mon directeur de thèse mettait le doigt sur le mécanisme qui allait permettre d'expliquer l'originalité du comportement de transport de PQLC2, et de construire l'ensemble du puzzle. Ce moment particulier, sans doute pour moi le plus excitant et inoubliable de ma thèse, était à l'origine d'une discussion qui débiterait en milieu de journée, et qui se terminerait tard dans la pénombre, sans que

nous n'ayons vu la nuit tomber. A partir de ce moment, et jusqu'à la fin de mes quatre années de thèses, les expériences sur ce projet ont été prolifiques.

Mon axe de recherche sur le modèle murin KO se développait quant à lui rapidement, et les premières souris KO voyaient le jour moins d'un an après le début de mes travaux. Je commençais ainsi la caractérisation de ce KO, et j'entamais la production du modèle murin de cystinose dépourvue de PQLC2. Ce dernier point révélera un phénotype inattendu qui nous permettra de proposer une hypothèse originale quant au rôle de PQLC2 à l'échelle de l'organisme. Je me consacrais donc prioritairement, en utilisant ce modèle murin plus complexe, à l'objectif n°3 plutôt qu'à l'objectif n°2.

Ce manuscrit présente cette expérience de recherche, dans lequel mes deux axes de recherche apparaissent sous la forme de deux chapitres distincts. L'approche et les méthodes utilisées font l'objet d'un chapitre préalable. La conclusion générale fait un point sur les découvertes effectuées et met en perspective les processus biologiques dans lesquelles elles pourraient intervenir.

Ces quatre années de thèse ont été financées par une fondation américaine dédiée à la cystinose, la « Cystinosis Research Foundation » (CRF). Ce financement incluait notamment ma bourse doctorale.

INTRODUCTION

1. Le lysosome

1.1. Généralités

Découvertes et grandes fonctions

Le lysosome est un organe intracellulaire découvert par Christian de Duve en 1955 (De Duve *et al.*, 1955). A cette époque, le développement de méthodes biochimiques de centrifugation différentielle rendait possible la séparation de la cellule en plusieurs fractions subcellulaires. La découverte d'une enzyme spécifiquement localisée dans l'une de ces fractions, la glucose-6-phosphatase, posa les bases de la découverte d'une structure limitée par une membrane, à contenu acide, et de densité intermédiaire entre les mitochondries et les microsomes, nommée par la suite « lysosome » (Bainton, 1981; de Duve, 2005). La visualisation de ces vésicules par microscopie électronique en 1956 confirma leur existence (Novikoff, Beaufay, and De Duve 1956 ; **figure 1**).

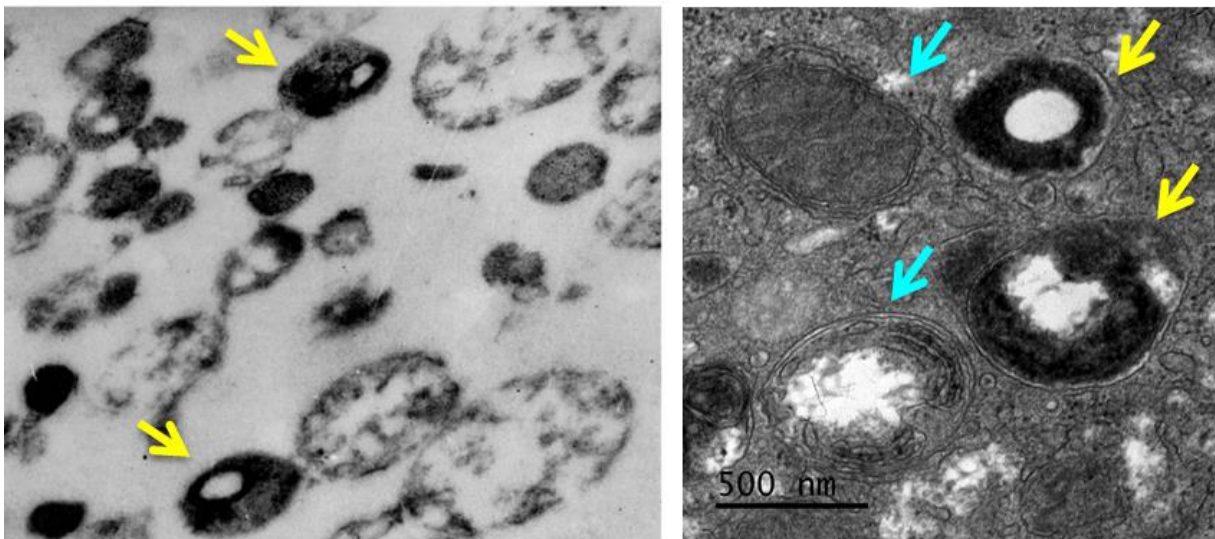


Figure 1 : Images de lysosomes en microscopie électronique.

Gauche : Première image de lysosomes de rat purifiés (modifié d'après Novikoff et al. 1956). Droite : Lysosomes dans une cellule de souris, réalisées dans le cadre d'une collaboration avec le Plateau technique « Imagerie Cellulaire & Moléculaire » de l'Université Paris Descartes dirigé par Bruno Saubaméa. Les flèches jaunes indiquent les lysosomes (membrane simple). Les flèches bleues indiquent les autophagosomes (double membrane).

Soixante ans plus tard, le lysosome est un organe délimité par une bicouche lipidique simple (membrane) circulaire, de taille (0.1-1 μ m) et de contenu extrêmement variable présent dans toutes les cellules animales (excepté les globules rouges) (**figure 1**). Il contient plus de 70 protéines luminales, dont 60 hydrolases acides, et 50 protéines membranaires clairement identifiées. Ce chiffre évolue encore de nos jours (Chapel et al. 2013; Schröder et al. 2010; Settembre et al. 2013). C'est un organe extrêmement mobile, capable de fusionner et d'interagir de manière dynamique avec d'autres constituants cellulaires (Luzio, Pryor and Bright, 2007; Settembre *et al.*, 2013; Luzio *et al.*, 2014).

Actuellement, on considère le lysosome comme un acteur important des grands processus cellulaires tels que la maintenance des macromolécules et organites cellulaires et le recyclage de leurs composants élémentaires (autophagie), la nutrition cellulaire, la mort cellulaire programmée et très récemment, la réponse au stress oxydant.

Rôle dans la nutrition cellulaire

Certains nutriments ne sont assimilables par les cellules que par des voies métaboliques impliquant le lysosome. C'est le cas notamment de la vitamine B12, du cholestérol et du fer (Gahl, 1989). Ces molécules, présentes dans la circulation sanguine sous forme libre ou complexée à une molécule de transport (par exemple le LDL pour le cholestérol) sont captées par des récepteurs de haute affinité présents à la membrane plasmique des cellules, puis sont internalisés par endocytose. La voie d'endocytose permet *in fine* l'acheminement du complexe cargo-récepteur au lysosome, dont l'acidité permet la dissociation. Le métabolite ainsi libéré est exporté hors du lysosome vers le cytosol par des transporteurs de la membrane du lysosome. Dans certains cas (vitamine B12), la protéine soluble (transcobalamine) complexée au nutriment doit être dégradée dans le lysosome pour libérer ce dernier.

A ce rôle clé d'apport spécifique de nutriments essentiels pour la cellule, le lysosome participe également à l'approvisionnement en composants de bases (acides aminés, acides gras, sucres) par le recyclage de composants endogènes ou exogènes à la cellule. Ce point sera détaillé plus en détail dans la prochaine section.

Rôle dans la mort cellulaire programmée

Le lysosome est un organe au contenu extrêmement dangereux car les enzymes qu'il contient ont pour fonction de dégrader les constituants cellulaires. Elles sont donc confinées et séparées du reste du cytosol par l'intermédiaire d'une membrane lipidique. Si cette membrane protectrice vient à être fragilisée (« perméabilisation »), les dégâts importants occasionnés et la destruction de protéines clés causeront irrémédiablement la mort de la cellule.

En fonction du niveau de perméabilisation du lysosome, et donc de la quantité d'enzymes transloquées dans le cytosol, on distingue deux processus de mort cellulaire.

La nécrose incontrôlée, pouvant être associée à la rupture des membranes des lysosomes, et donc à une libération massive d'enzymes, est un cas extrême. Elle ne fait pas partie du programme de maintenance du tissu et, de ce fait, peut être néfaste pour sa fonction ou son développement. En effet, le contenu de la cellule et les enzymes lysosomales seront possiblement déversés dans l'environnement de la cellule lysée (Terman *et al.*, 2006).

La mort cellulaire lysosomale (mort cellulaire de type 2), est un processus contrôlé par la cellule (Gomez-Sintes, Ledesma and Boya, 2015). Elle est induite par la perméabilisation sélective de la membrane de lysosomes ciblés par l'intermédiaire de molécules endogènes, comme par exemple les membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 (Bax, Bim...), ou exogènes comme certaines toxines de bactéries (VepA de *Vibrio cholerae* ou la Pneumolysine de *Streptococcus pneumoniae*). Ces molécules induisent la translocation d'enzymes lysosomales actives à pH neutre, les Cathepsine B et D, qui, une fois dans le cytosol, induiront la perméabilisation des membranes mitochondriales et l'activation des caspases menant ainsi à la mort cellulaire par apoptose. De nombreuses pathologies, notamment neurodégénératives, présentent une mort cellulaire lysosomale exacerbée.

Les processus d'autophagies sont étroitement liés aux processus d'apoptose. Cette relation subtile et complexe encore mal comprise fait également intervenir le lysosome comme un élément régulateur important de la mort cellulaire programmée (Fitzwalter and Thorburn, 2015).

Rôle dans la réponse au stress oxydant

Très récemment, un nouveau mécanisme de réponse de la cellule au stress oxydant faisant intervenir le lysosome a été mis à jour (Zhang *et al.*, 2016). Cette étude montre que des conditions de stress oxydant, induites par l'ajout d'agents oxydants ou par la libération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) par les mitochondries, mènent, par son oxydation, à l'activation spécifique et directe d'un canal de la membrane lysosomale, TRPML1, perméable au calcium. Le calcium ainsi libéré va permettre *in fine* de favoriser la biogénèse lysosomale et l'autophagie pour permettre à la cellule de nettoyer les composants défectueux et dangereux. Cette voie fait intervenir TFEB, un facteur de transcription clé qui sera présenté dans une autre section.

1.2. Le lysosome comme usine de maintenance et de recyclage

Le lysosome est principalement connu pour son rôle dans la dégradation et le recyclage des composants extracellulaires (endocytose) ou intracellulaires (autophagie). Ce processus fait intervenir plus de 60 hydrolases acides spécialisées dans la dégradation des protéines, sucres, lipides et acides nucléiques en constituants de bases (acides aminés, oses...) (Schröder *et al.*, 2010). Il participe ainsi à la nutrition cellulaire et à la protection de la cellule par l'élimination des organites défectueux ou des agrégats protéiques qui représentent une menace pour l'intégrité de la cellule.

C'est le cas, par exemple, des ROS produits en excès par les mitochondries endommagées introduits dans la section précédente. A la manière d'une centrale à recycler, cette fonction peut se décomposer en plusieurs étapes à savoir : l'import du matériel à recycler, le recyclage en matière première et l'export de la matière première. A chacune de ces étapes, différents acteurs clés de la lumière ou de la membrane du lysosome sont impliqués (**figure 2**).

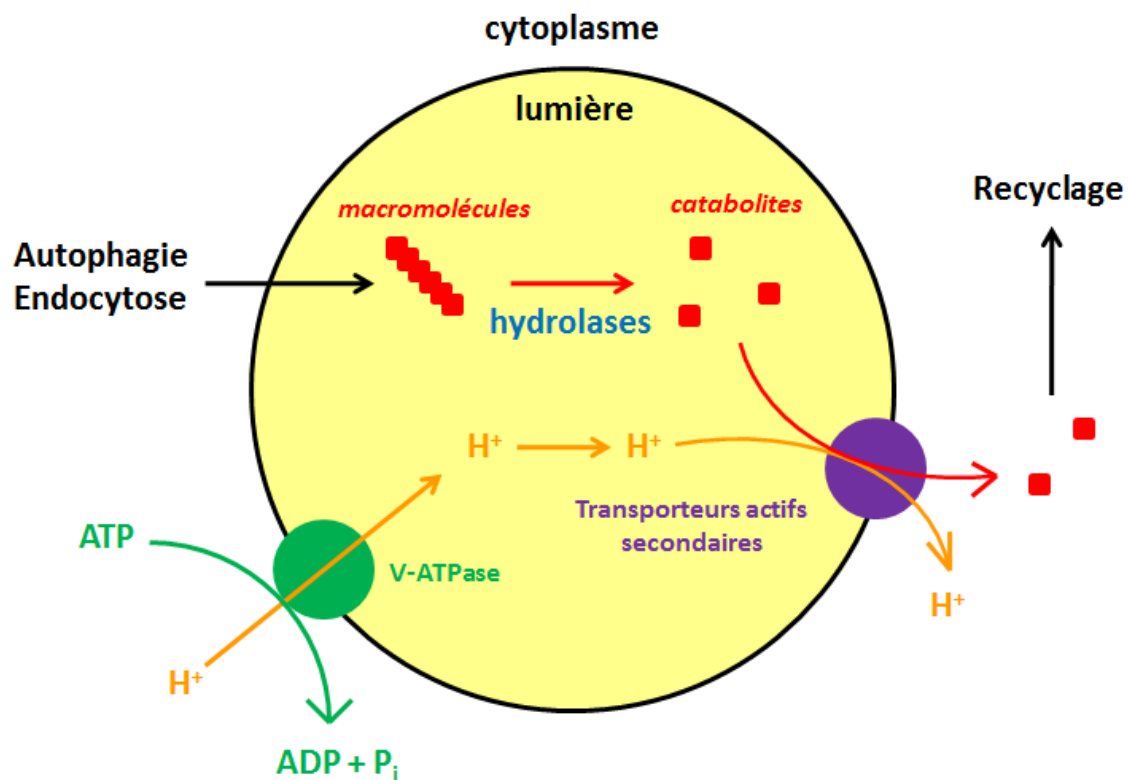


Figure 2 : Organisation générale du lysosome dans son rôle d'usine de maintenance et de recyclage.

Modifié avec autorisation d'après Quentin Verdon.

Import du matériel à dégrader et recycler

Le matériel à dégrader et à recycler est tout d'abord importé. Cette étape peut être réalisée par la fusion du lysosome avec les vésicules contenant le matériel à recycler. Le matériel exogène provient alors de voies d'endocytoses (Klumperman and Raposo, 2014), tandis que le matériel endogène provient d'autophagosomes de la voie macroautophagique (He and Klionsky, 2009) ou microautophagique (Mijaljica, Prescott and Devenish, 2011). Comme pour les autres phénomènes de fusion membranaire, elle fait intervenir des protéines SNARE et des protéines GTPases Rab (Mullock *et al.*, 1998; Luzio, Pryor and Bright, 2007). Certaines protéines provenant directement du cytoplasme peuvent également être directement importées dans la lumière du lysosome en

traversant sa membrane avec l'aide de protéines chaperon (CMA : chaperone-mediated autophagy). La protéine à dégrader est reconnue par la protéine chaperon hsc70 et est amenée à la membrane du lysosome par interaction avec la protéine membranaire lysosomale LAMP-2A. LAMP-2A se multimérise alors et forme un pore, qui permettra la translocation de la protéine déboulinée dans la lumière du lysosome. Ce dépliement fait intervenir hsc70 et le complexe LAMP-2A (Kaushik and Cuervo, 2012).

Recyclage en matière première

Une fois importées dans la lumière du lysosome, les macromolécules ou les organites sont hydrolysées par des hydrolases activées à pH acide. Le pH acide de la lumière est un des paramètres fondamentaux qui caractérise le lysosome. L'acidification est réalisée par une V-ATPase (« V » pour vacuolaire ou vésiculaire), un transporteur primaire qui permet le transport de deux protons dans la lumière du lysosome pour l'hydrolyse d'une molécule d'ATP (Klaus W. Beyenbach and Helmut Wieczorek, 2006). Cette activité permet de générer un pH luminal aux alentours de 4.5.

Export de la matière première

Finalement, les catabolites générés par l'hydrolyse lysosomale sont exportés vers le cytoplasme par l'intermédiaire de transporteurs membranaires. La membrane du lysosome est ainsi pourvue d'une multitude de transporteurs spécialisés dans l'export de ces différents substrats. La plupart utilisent le gradient de protons comme source d'énergie (Ruivo *et al.*, 2009). Ils couplent ainsi l'export d'une molécule de substrat à un proton, on parle alors de transporteurs secondaires de type symport.

Maladies de stockage lysosomal

De nombreuses pathologies sont causées par la perte de fonction de l'une de ces protéines lysosomales. On les regroupe sous le nom de maladies de stockage lysosomal (LSD). Ce sont des maladies génétiques héréditaires rares caractérisées par l'accumulation du substrat non dégradé ou non exporté dans la lumière du lysosome (Lieberman *et al.*, 2012). C'est le cas de la maladie de Gaucher, qui touche le gène qui code pour la glucocérébrosidase, l'enzyme qui catabolise les glucosylcéramides et les glucosylsphingosines ; ou bien de la cystinose, qui est causée par une mutation dans le gène du transporteur lysosomal de cystine, la cystinosine. Les symptômes des maladies lysosomales apparaissent souvent progressivement avec l'âge et comprennent en général une atteinte du système nerveux central, du foie et de la rate, du cœur, des os et des muscles (Platt, Boland and van der Spoel, 2012). Une description clinique de la cystinose est présentée à la fin de ce chapitre.

Diversité des rôles cellulaires de la dégradation lysosomale

Ainsi, le lysosome est l'organite spécialisé de la dégradation cellulaire et du recyclage. Il possède une activité basale (autophagie basale), mais peut également être recruté et stimulé ; on parle alors d'autophagie induite (Ravikumar *et al.*, 2010).

L'autophagie induite est initiée pour supplémer la cellule en nutriments par recyclage de constituants cellulaires lors de carences nutritionnelles, ou lorsqu'une dégradation accrue de composants cellulaires ou extracellulaires est nécessaire. Son rôle dans le recyclage des constituants cellulaires en nutriments est fondamental dans de nombreuses situations physiologiques. C'est le cas notamment lors du développement embryonnaire ou de la période néonatale où l'organisme doit tirer une grande partie de son énergie du recyclage de composants devenues inutiles (Mizushima and Levine, 2010). La dégradation de composants cellulaires ou extracellulaires peut intervenir dans la défense contre des micro-organismes pathogènes (Deretic, Saitoh and Akira, 2013), la dégradation d'organites défectueux dangereux, comme les mitochondries (Zhang, 2013), mais également dans la dégradation des agrégats protéiques retrouvés dans des pathologies comme la maladie de Parkinson ou d'Alzheimer (Nixon, 2013).

En assurant toutes ces fonctions, les lysosomes participent ainsi à l'homéostasie cellulaire.

1.3. Le lysosome comme plateforme de signalisation

Le rôle cellulaire donné au lysosome a pendant longtemps été restreint à celui d'usine à recycler. Une des avancées majeures de ces dix dernières années est la découverte de son implication en tant que plateforme de signalisation de la protéine kinase mTOR, un chef d'orchestre du métabolisme et de la croissance cellulaire. Un des éléments clés de cette fonction est l'activation du complexe 1 de mTOR (mTORC1) par les acides aminés intracellulaires (Zoncu, 2012) via son recrutement à la membrane lysosomale par le complexe Ragulator-Rag (Sancak *et al.*, 2010).

mTORC1 est activé à la surface du lysosome

La protéine mTOR (mammalian target of rapamycin) est une Ser/Thr kinase qui, par interactions/associations avec d'autres protéines forme le complexe mTORC1. mTORC1 est un complexe majeur de signalisation cellulaire car il intègre des signaux nombreux et variés tels que les facteurs de croissance, les hormones, les acides aminés intracellulaires, le glucose, le statut énergétique ou le stress oxydatif et il régule, en fonction de ces signaux, l'équilibre entre croissance cellulaire et autophagie.

Lors d'une carence nutritionnelle, les différentes voies anaboliques sont réprimées (synthèse protéique, lipidique...). Le complexe mTORC1 est alors inactif et possède une localisation cytosolique encore mal définie. Les processus d'autophagie sont quant à eux stimulés, ce qui permet de

compenser le manque de nutriments exogènes par le recyclage des constituants cellulaires afin de garantir l’approvisionnement énergétique et nutritionnel des voies métaboliques. La mobilisation des acides aminés endogènes par la protéolyse lysosomale permet alors la réactivation de mTORC1 (**figure 3**).

mTORC1 est activé par son interaction avec RHEB (Long *et al.*, 2005). RHEB (Ras homologue enriched in brain) est une petite GTPase spécifique au système endomembranaire, qui est régulée par les facteurs de croissance ou par le statut énergétique de la cellule (Laplante and Sabatini, 2012). La raison pour laquelle l’activation de mTORC1 se produit spécifiquement au niveau du lysosome provient de la présence de RHEB à la surface de cet organelle, mais également de l’existence d’un système capable de transloquer mTORC1 du cytoplasme à la membrane du lysosome. Cette translocation est médiée par le complexe RAG (Sancak *et al.*, 2008, 2010).

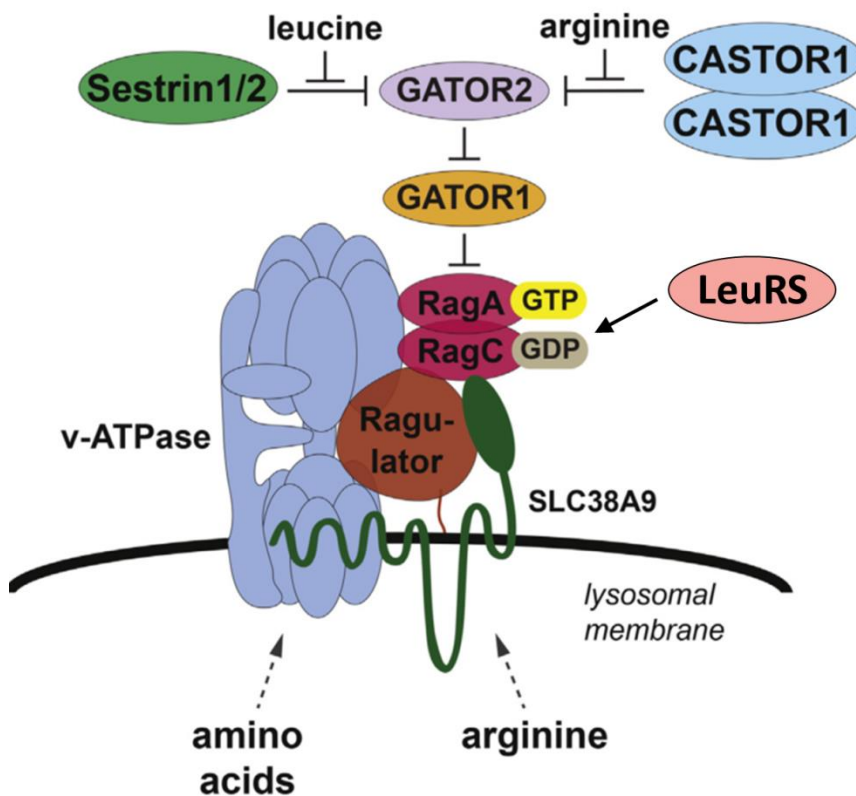


Figure 3 : Voies de régulation des complexes RagA/B et RagC/D par les acides aminés permettant le recrutement de mTORC1 à la membrane lysosomale.

Modifié d’après Chantranupong *et al.* 2016.

Le complexe RAG est un hétérodimère composé de deux petites GTPases différentes, qui peuvent être de deux types différents chacune : RagA ou RagB (Rag(A/B)) et RagC ou RagD (Rag(C/D)). Leurs

activités sont régulées par le pool d'acides aminés cytosolique et lysosomal. Le complexe RAG est actif lorsque Rag(A/B) lie le GTP et Rag(C/D) lie le GDP.

La voie cytosolique fait intervenir la Leucyl-tARN Synthétase et les complexes GATOR1 et 2. La Leucyl-tARN Synthétase est activée par la leucine (Han *et al.*, 2012). Les complexes GATOR1 et 2 (Bar-Peled *et al.*, 2013) sont régulés par la Sestrin2, (Wolfson *et al.*, 2015) un senseur de leucine, et par la protéine CASTOR1 qui est un senseur d'arginine (Chantranupong *et al.*, 2016).

La voie lysosomale fait intervenir le complexe Ragulator. Ce complexe sert de facteur d'échange GEF (Guanine Exchange Factor) pour les Rag, ce qui les active (Bar-Peled *et al.*, 2012). L'activation du complexe Ragulator-RAG par les acides aminés fait intervenir la V-ATPase. Une hypothèse, proposée par David Sabatini, postule l'activation de mTORC1 par un mécanisme de détection du pool intralysosomal d'acides aminés, particulièrement sensible à l'arginine et la leucine (Hara *et al.*, 1998; Zoncu, 2012). Un des senseurs de ces acides aminés serait le transcepteur SLC38A9 qui détecterait le niveau d'arginine lysosomale et, par la liaison de l'arginine, permettrait d'activer mTORC1. Le rôle joué par la V-ATPase reste à l'heure actuelle inconnu, mais elle est un effecteur de mTORC1. L'identification et le rôle de SLC38A9 ont quant à eux été récemment identifiés (Jung, Genau and Behrends, 2015; Rebsamen *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2015).

SLC38A9 (human member 9 of the solute carrier family 38) est une protéine transmembranaire lysosomale capable de transporter l'arginine à basse affinité (Km estimé à 39 mM dans des expériences de transport sur protéoliposomes; Wang *et al.* 2015). Elle serait activée par la présence d'acides aminés dans la lumière du lysosome par un mécanisme de « transception » plutôt que de transport proprement dit, c'est-à-dire que la liaison de l'arginine lysosomale agirait en modifiant la conformation de SLC38A9 plutôt qu'en étant transportée (la prochaine section fait un point sur ce mécanisme ; **figure 4**). Ce changement de conformation, plutôt que la translocation d'Arg, permettrait par interaction physique l'activation du complexe Ragulator-RAG, qui à son tour permet le recrutement de mTORC1 à la surface de la membrane et son activation. L'ensemble de ces acteurs forme ainsi une véritable plateforme de détection du statut nutritionnel de la cellule.

Le rôle du lysosome dans l'activation de mTORC1 est donc double. D'une part, il lui sert de plateforme de signalisation et d'ancrage pour mTORC1. D'autre part, il produit des acides aminés par le biais de la protéolyse lysosomale qui seront détectés par les différents senseurs d'acides aminés de la cellule et permettront *in fine* de le stimuler. Deux acides aminés semblent essentiels pour jouer ce rôle : la leucine cytosolique et l'arginine. L'arginine possède un statut particulier car elle agit dans le cytosol et dans la lumière lysosomale. Enfin, à l'échelle de la cellule, d'autres acides aminés affectent mTORC1. C'est le cas par exemple de la glutamine qui active mTORC1 par une voie distincte des GTPases Rag impliquant la V-ATPase et la GTPase Arf1 (Jewell *et al.*, 2015). A l'avenir, de nouveaux mécanismes de régulation de mTORC1 impliquant les acides aminés seront probablement découverts.

L'activation de mTORC1 à la membrane du lysosome a de nombreux effets aussi importants que variés pour la cellule (Jewell, Russell and Guan, 2013; Settembre *et al.*, 2013) : stimulation de la biosynthèse de macromolécules, du métabolisme, de la croissance et de la prolifération cellulaire. Son activation permet aussi l'inhibition de l'autophagie par la phosphorylation du complexe ULK1–ATG13–FIP200, qui stimule la formation d'autophagosomes dans sa forme déphosphorylée (Lin and Hurley, 2016). mTORC1 inhibe aussi en le phosphorylant un facteur clé de la transcription des gènes spécifiques du lysosome, le facteur de transcription TFEB.

Zoom sur le transcepteur SLC38A9

Les transporteurs peuvent agir en tant que récepteur. Dans leur revue dédiée à ce sujet, dans le cadre de la détection de nutriments, Holsbeek et al. discriminent ainsi trois cas possibles de transporteurs (Holsbeeks *et al.*, 2004) :

- 1) Les transporteurs à proprement parler qui, de par leurs uniques fonctions de transport de substrats, vont réguler le flux de molécules pouvant être impliquées dans des voies de signalisation. Ils ne possèdent donc pas de rôle de récepteur, c'est-à-dire que leur transconformation suite à la liaison du ligand n'est pas associée à l'activation physique d'une molécule signal effectrice d'une voie de signalisation.
- 2) Les transporteurs-récepteurs dont la transconformation associée à la translocation du substrat active ou inhibe par interaction physique une molécule signal effectrice d'une voie de signalisation.
- 3) Les transporteurs-récepteurs qui ont perdu leur propriété de transport. Ce sont des homologues des transporteurs-récepteurs dont on suppose que l'évolution leur a fait perdre la fonction de transport. Ils peuvent ainsi lier leur substrat, mais leur transconformation ne permet pas, ou très peu, la translocation du substrat.

Les deux dernières catégories peuvent être regroupées sous le nom de « transcepteur ».

SLC38A9 a été découvert de manière concomitante par trois groupes de recherches (Jung, Genau and Behrends, 2015; Rebsamen *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2015). Leurs résultats apportent des preuves solides quant à son interaction par le biais de son domaine N-terminal, localisé dans le compartiment cytosolique, avec le complexe Ragulator et le complexe RAG inactif. Les expériences d'interférence d'ARN et de surexpression de SLC38A9 suggèrent clairement qu'il soit un effecteur du complexe Ragulator-RAG, et donc de mTORC1, plutôt qu'une cible de ce dernier.

Les études de Rebsamen et al. et de Wang et al. comportent des expériences de transport d'acides aminés radioactifs dans des protéoliposomes reconstitués possédant SLC38A9 à leur membrane. Leurs résultats divergent en partie sur la sélectivité du substrat transporté (**figure 4**).

En effet, pour Rebsamen et al., la glutamine est l'acide aminé le mieux transporté (**figure 4. Bas. Milieu**). L'Arg serait également transportée mais, curieusement, elle n'inhibe pas le transport de

glutamine (10 μ M), où à peine (80 % d'activité résiduelle en présence d'1mM d'Arg froide ; **figure 4. Bas. Gauche**). Cependant, les cinétiques d'accumulation de glutamine tritiée par des liposomes reconstitués en présence de SLC38A9 sont peu convaincantes, le signal spécifique étant très faible (**figure 4. Bas. Droite**).

Le papier publié par Wang et al. privilégie le transport d'Arg par SLC38A9 avec un Km de 39 mM (**figure 4. Bas**).

En conclusion, ces expériences positionnent SLC38A9 comme un transcepteur détectant la présence d'acides aminés intralysosomaux pour l'activation de mTORC1, avec une spécificité particulière pour l'arginine.

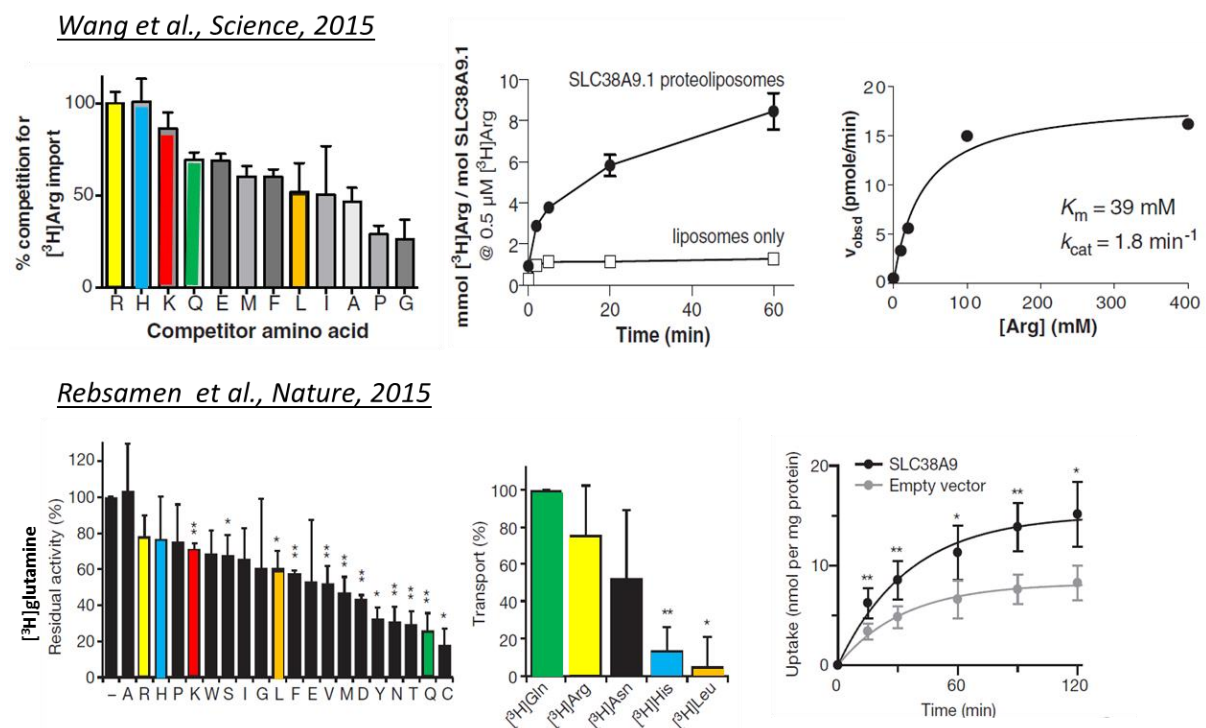


Figure 4 : Divergences entre les résultats des deux articles princeps de la découverte de SLC38A9 sur la sélectivité de substrat transporté.

Haut : résultats présentés dans l'article publié dans « Science » par Wang et al. 2015 sur la sélectivité de transport de SLC38A9 vis à vis des acides aminés. Gauche : expérience de compétition de transport d'arginine tritiée (10 μ M) en présence de 100 mM de l'acide aminé indiqué. Milieu : cinétique d'accumulation d'arginine tritiée par des liposomes reconstitués en présence ou en absence de SLC38A9. Droite : courbe de saturation du transport de l'Arg dans les protéoliposomes reconstitués en présence de SLC38A9.

Bas : résultats présentés dans l'article publié dans « Nature » par Rebsamen et al. 2015 sur la sélectivité de transport de SLC38A9 vis à vis des acides aminés. Gauche : expérience de compétition de transport de glutamine tritiée (10 μ M) en présence de 1 mM de l'acide aminé indiqué. Milieu : expérience de transport d'acides aminés tritiée par SLC38A9 reconstitué dans des protéoliposomes. Droite : cinétique d'accumulation de glutamine tritiée par des liposomes reconstitués en présence ou en absence de SLC38A9.

Existence d'un mécanisme de rétrocontrôle transcriptionnel adaptant la biogénèse lysosomale aux besoins dégradatifs de la cellule

La deuxième avancée majeure de ces 10 dernières années dans le domaine des lysosomes est la découverte d'un réseau de gènes, nommé CLEAR (Coordinated Lysosomal Expression and Regulation) sous la dépendance d'un facteur de transcription régulé par mTORC1 : TFEB (transcription factor EB) (Sardiello, Marco, Palimieri Michela, Di Ronza Alberto, Medina Diego Luis, 2009; Napolitano and Ballabio, 2016). Parmi les gènes ciblés, on trouve la majorité des composants du lysosome, comme des enzymes protéolytiques telle que la cathepsine D, des sous unités de la V-ATPase, ainsi que des acteurs impliqués dans le trafic et la fusion des lysosomes et des autophagosomes. On a identifié deux situations majeures associées à l'activation de ce réseau : la carence nutritionnelle et la surcharge lysosomale.

Lorsque les conditions nutritives sont bonnes, mTORC1 est actif à la membrane du lysosome et phosphoryle TFEB, le rendant ainsi inactif. TFEB est alors localisé dans le compartiment cytosolique. Les lysosomes sont alors de tailles hétérogènes (100-500 nm de diamètre), en nombre important (plusieurs centaines) et distribués sans localisation privilégiée dans la cellule. La carence nutritionnelle réprime le recrutement à la membrane lysosomale de mTORC1 et l'inactive. Elle provoque ainsi la réduction du nombre de lysosomes par leur fusion avec les autophagosomes, l'augmentation de leurs tailles et limite leur migration, les rapprochant ainsi du centre organisateur des microtubules situé proche du noyau (Korolchuk *et al.*, 2011; Mleczak *et al.*, 2013). Elle induit également la levée de l'inhibition de TFEB par mTORC1. TFEB est alors rapidement transloqué dans le noyau et va induire la transcription des gènes du réseau CLEAR, ce qui permet d'induire la biogénèse lysosomale et l'autophagie. La mobilisation de nutriments, dont les acides aminés, issus de la dégradation des composants de la cellule est ainsi stimulée pour corriger la carence nutritionnelle (**figure 5**).

TFEB peut également être activé dans des conditions nutritives favorables, mais lorsque la cellule nécessite de dégrader de manière massive du matériel biologique en train de s'accumuler. On parle alors de surcharge lysosomale. Cette surcharge inhibe mTORC1 par un mécanisme encore inconnu et permet ainsi l'activation de TFEB qui va induire, en plus de la biogénèse lysosomale et de l'autophagie, l'exocytose des lysosomes. De nombreuses pathologies sont associées à ce stress cellulaire accru pouvant conduire à la mort cellulaire. C'est le cas d'infections par des pathogènes intracellulaires ou de maladies neurodégénératives associées à la formation d'aggrégats protéiques dans le compartiment cytosolique. C'est également le cas des maladies de stockage lysosomal. Le potentiel thérapeutique d'une molécule capable de stimuler TFEB est donc énorme, car il permettrait de réduire l'accumulation de ces catabolites et ainsi de diminuer ce stress cellulaire. Sur des modèles animaux, ces molécules thérapeutiques semblent diminuer le développement de ces maladies, mais favorise en contrepartie le développement de cancer. Le temps et les études permettront de confirmer ou non le pouvoir de cette cible thérapeutique prometteuse (Napolitano and Ballabio, 2016).

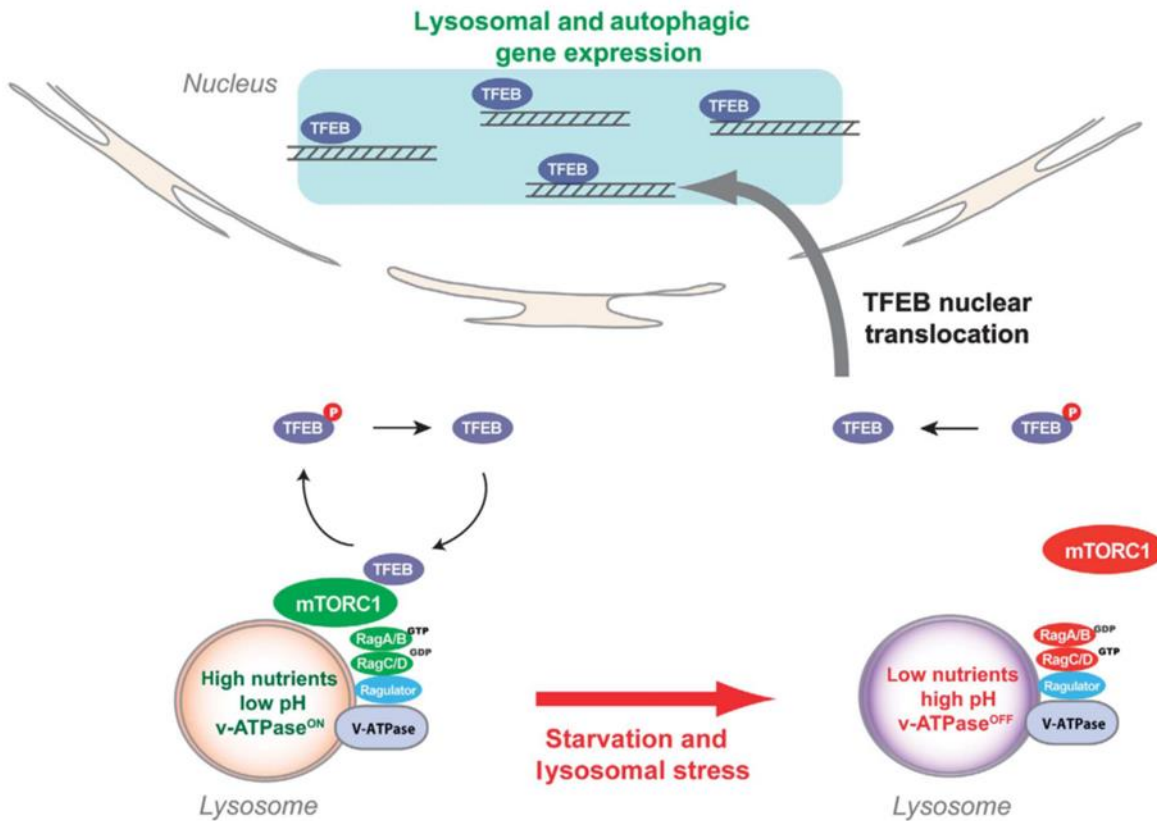


Figure 5 : Voie de signalisation mTORC1/TFEB.

En cas de carence nutritive ou de surcharge lysosomale, l'inhibition de mTORC1 permet la levée de l'inhibition du facteur de transcription TFEB, qui est alors transloqué dans le noyau, et permet l'expression d'un réseau de gènes impliqués dans la biogénèse lysosomale, l'autophagie et l'exocytose des lysosomes.

D'après Settembre et al. 2012.

Ainsi, le mécanisme mTORC1/TFEB permet à la cellule d'adapter le pool et l'activité des lysosomes à ses besoins dégradatifs.

Finalement, il apparait que d'autres membre de la famille des facteurs de transcription MiT, dont TFEB fait parti, sont également influencés par la voie de signalisation impliquant mTORC1 et participent à la réponse au stress cellulaire. C'est le cas des facteurs de transcription TFE3 et MITF (Napolitano and Ballabio, 2016).

2. PQLC2, le transporteur lysosomal d'acides aminés cationiques

2.1. Généralités sur les transporteurs secondaires

Il existe trois classes de protéines de transport membranaires : les transporteurs primaires, les transporteurs secondaires, et les canaux.

Le concept d'accès alterné

Le modèle d'accès alterné est un concept développé depuis les années 1950 qui permet de rendre compte de la différence fondamentale entre les canaux et les transporteurs, à savoir que la conformation de ces derniers alterne entre deux états où le site de liaison du substrat est exposé d'un côté ou de l'autre de la membrane (Drew and Boudker, 2016). Le modèle d'accès alterné permet ainsi de représenter un transporteur sous la forme d'un cycle comportant, au minimum, 4 étapes toutes réversibles (**figure 6**) : le transporteur peut être tourné vers le compartiment extérieur (OUT) dans un état « vide », c'est à dire sous une forme non liée à son substrat (état 1), et sous une forme liée au substrat (2). De la même manière, il peut être tourné vers le compartiment intérieur (IN) dans un état vide (3) ou lié au substrat (4).

Le changement de conformation des transporteurs primaires nécessite une véritable transduction d'énergie avec notamment des étapes irréversibles comme, par exemple, l'hydrolyse d'ATP (ter Beek, Guskov and Slotboom, 2014). On parle de « pompes ». C'est le cas par exemple de la V-ATPase lysosomale.

Il existe plusieurs types de transporteurs secondaires classés en fonction de leur couplage énergétique, c'est-à-dire en fonction de la possibilité qu'ils ont de se transconformer sous une forme libre ou liée à un ou plusieurs ligands (Forrest, R., Lucy; Rudnick, 2009; Drew and Boudker, 2016) (**figure 6**).

Les uniporteurs, ou transporteurs passifs, partagent avec les canaux le fait qu'ils ne réalisent pas de transport net de substrat contre son gradient de concentration. En revanche, ils transportent leur substrat par un mécanisme d'accès alterné plutôt que de diffusion à travers un pore traversant la membrane de manière continue, comme c'est le cas pour les canaux. La vitesse de transport des uniporteurs est donc beaucoup plus faible et limitée que celles des canaux (saturation). Ils sont affectés par la température et sont potentiellement *trans*-stimulable (voir la section suivante). Les uniporteurs alternent les états tournés vers l'extérieur et tournés vers l'intérieur de manière stochastique et participent ainsi à la dissipation du gradient de concentration (ou gradient électrochimique si le substrat est chargé) du substrat transporté. Ils ne nécessitent donc pas de source d'énergie autre que leur gradient de concentration et le gradient électrique.

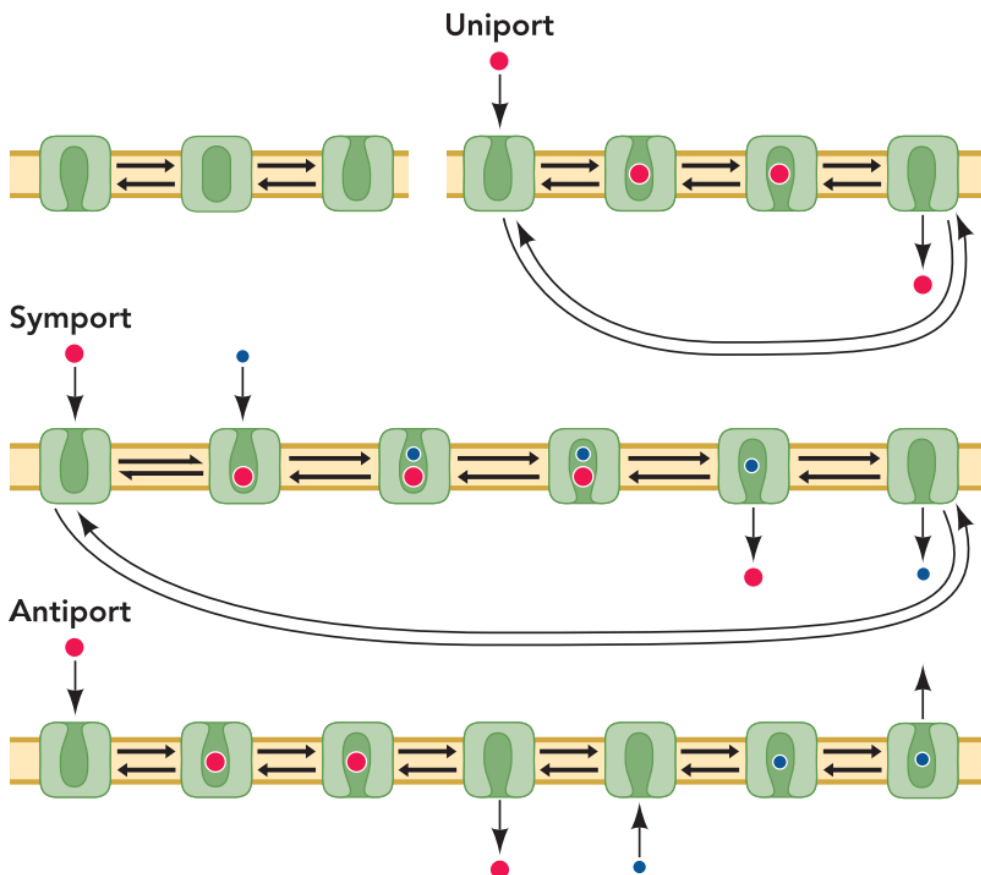
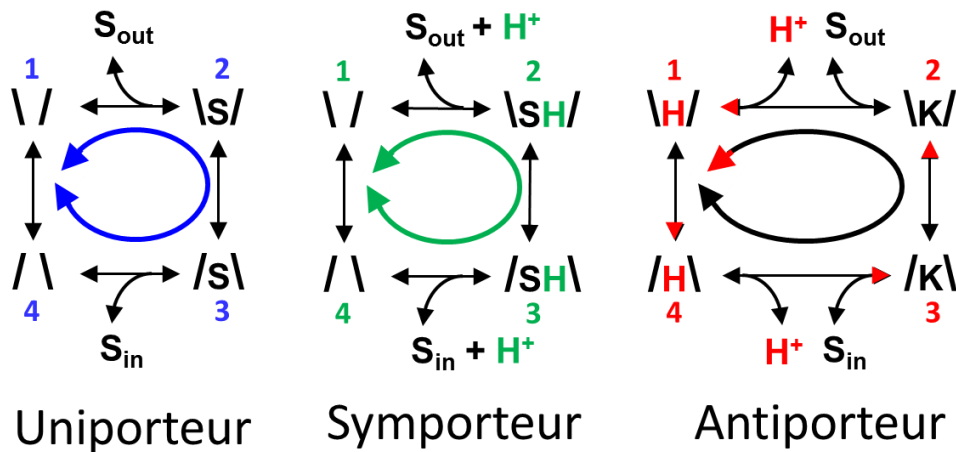


Figure 6 : Présentation des différents modes de transport des transporteurs secondaires.

Schéma supérieur : cycles cinétiques de transport selon le mode de couplage. A titre d'exemple, nous avons considéré le cas d'un couplage aux protons avec une stoechiométrie 1:1 pour le symport et l'antiport.

Schéma inférieur : illustration structurale des cycles de transport, d'après Forrest and Rudnick 2009.

Les transporteurs actifs secondaires couplent le transport de leur substrat à celui d'une/autres molécule(s), généralement des ions inorganiques. Ils transfèrent ainsi l'énergie dépensée par l'utilisation du gradient de l'ion couplé par le transport du substrat dans le milieu de destination, généralement contre son gradient de concentration. La stoechiométrie du couplage (le nombre d'ions

couplés au transport d'un substrat) peut être multiple en nombre et en types d'ions. De même, plusieurs molécules de substrats peuvent être transportées par cycle. Si le transporteur secondaire transporte le substrat et l'ion couplé dans la même direction, on qualifie le transport de symport. Si le transport du substrat et de l'ion s'effectue en sens opposés, le transport est de type antiport ; le transporteur est alors qualifié d'échangeur ou d'antiporteur.

Les différents modèles structuraux d'accès alterné

Toutes les structures connues des transporteurs ont un site de liaison au substrat unique et central (Forrest, R., Lucy; Rudnick, 2009; Drew and Boudker, 2016). Au final, une fois lié, c'est donc l'accessibilité du site de liaison à un côté ou l'autre de la membrane qui définit dans quel compartiment le ligand diffusera. On peut également voir le mécanisme de transport sous la forme du déplacement d'une « barrière ». Le passage d'un substrat d'un côté à l'autre de la membrane par le biais d'un transporteur se fera ainsi dans le sens opposé du déplacement de cette barrière d'un côté à l'autre de la membrane. Peter Mitchell a conceptualisé ce mécanisme sous le nom de « barrière mobile » (Mitchell, 1990). Notons que le transporteur peut ainsi, en plus des quatre états présentés dans la section précédente, être dans un état où le site de liaison, occupé ou non par son ligand, est inaccessible ni d'un côté, ni de l'autre de la membrane. On parle d'état occlus.

La majorité des transporteurs dont on connaît les structures utilise le principe de cette barrière mobile. On distingue deux mécanismes de transport : le « rocker switch » (littéralement « l'interrupteur à bascule » ; j'aime également l'image de la pince à linge) et le « rocking bundle » (balançoire) (**figure 7**).

Dans le mécanisme « **rocker switch** », le mouvement concerté de deux domaines symétriques du transporteur autour d'un site de liaison au ligand, immobile et central, permet de générer un accès alterné du site depuis l'un ou l'autre des compartiments séparés par la membrane.

Dans le mécanisme « **rocking bundle** », un des domaines est fixe et sert de point d'appui au deuxième domaine qui réalise un mouvement de balançoire par rapport au premier domaine. Le site de liaison au ligand est lui immobile et central. Le mouvement permet ainsi d'alterner l'accès du ligand depuis l'un ou l'autre des compartiments séparés par la membrane.

Il existe un troisième mécanisme, découvert plus récemment, appelé « **Elevator** » (ascenseur) (**figure 7**). Ce mécanisme se distingue des deux premiers mécanismes par le fait que ce n'est pas la barrière qui est déplacée lors du cycle de transport, mais le site de liaison du substrat. Un des domaines sert alors de point d'appui et l'autre, contenant le site de liaison, réalise un mouvement complexe associant une rotation et une translation par rapport au premier domaine. Ce mouvement se rapproche de celui du pédalier de vélo. Le ligand est ainsi déplacé de part et d'autre de la barrière fixe séparant les deux compartiments.

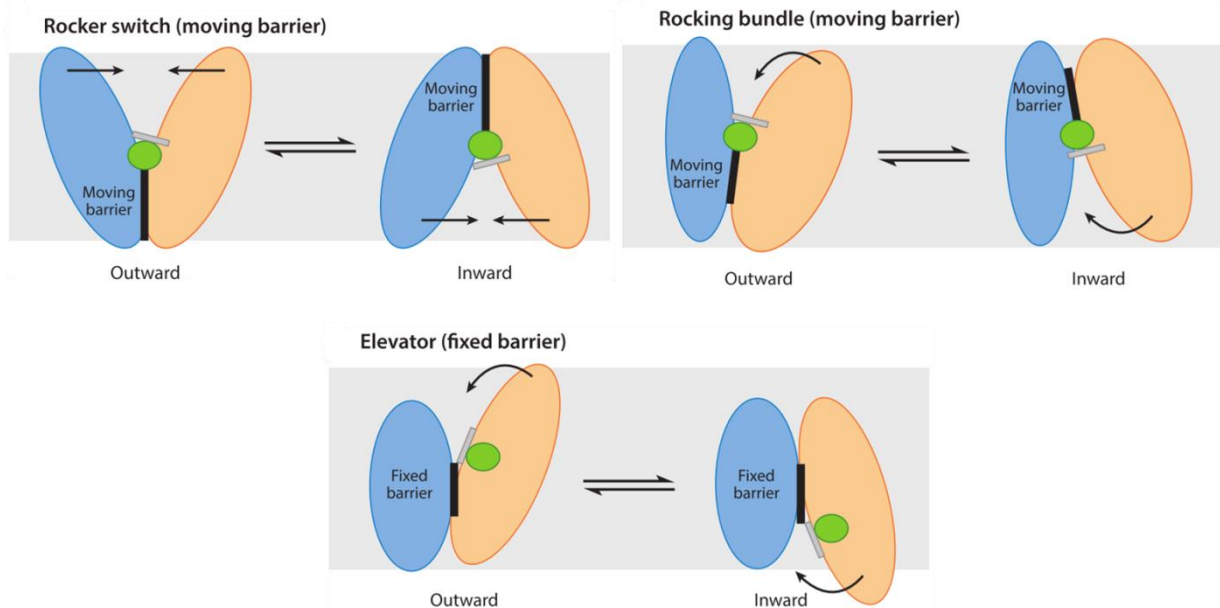


Figure 7 : Les différents modèles structuraux d'accès alterné dans les transporteurs secondaires.

Le trait noir représente la barrière. Le rond vert représente le ligand. Le trait gris représente une résistance à la sortie ou à l'entrée du ligand dans la poche du site de liaison du transporteur (on peut le voir comme une porte). Les ovales bleu et orange représentent les deux domaines du transporteur.

Figure extraite de l'article Drew and Boudker, 2016.

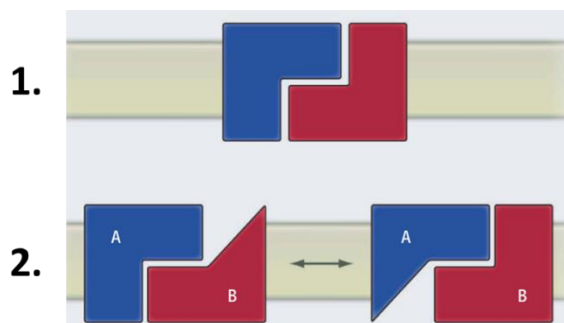


Figure 8 : La majorité des transporteurs secondaires, ainsi que certains canaux, sont organisés sous la forme deux domaines antiparallèles.

A la différence des canaux (1), il existe une différence de conformation entre les deux domaines des transporteurs secondaires (2). Cette différence génère une pseudo-symétrie qui permet l'accès alterné. Figure extraite de l'article de Lucy R. Forrest, 2013.

Un aspect intéressant commun à la majorité des canaux ou transporteurs membranaires est la présence de symétries internes dans l'arrangement conformationnel de ces protéines (Forrest, 2013; Shi, 2013). Dans le cadre des transporteurs secondaires, la symétrie la plus représentée correspond à une *pseudo* symétrie antiparallèle de deux domaines par rapport à un axe de symétrie d'ordre deux situé dans le plan de la membrane : les deux domaines sont têtes bêtes. Cette symétrie

antiparallèle est également retrouvée chez les canaux. Cependant, chez les transporteurs secondaires, les légères différences qui existent entre les deux domaines sont à l'origine d'une symétrie imparfaite (pseudo-symétrie) entraînant une bi-stabilité conformationnelle qui permet au transporteur de former la barrière vers un compartiment lorsque, dans le même temps, il donne l'accès au compartiment opposé (**figure 8**).

Concepts de *trans*-stimulation et de *trans*-inhibition

Mes résultats de thèse vont conduire à m'intéresser à un fonctionnement caractéristique des transporteurs qui découle de l'accès alterné. Je vais donc introduire ici ces concepts qui seront nécessaires pour interpréter et discuter une partie de ces résultats.

Si un transporteur transporte une molécule de substrat d'un compartiment 1 vers un compartiment 2, alors le compartiment 1 est nommé compartiment *cis* du transport et le compartiment 2 est nommé compartiment *trans* du transport. Les concepts de *trans*-stimulation et de *trans*-inhibition font ainsi référence à l'effet de la présence du substrat dans le compartiment *trans* sur la vitesse de transport du substrat provenant du compartiment *cis*. Ces propriétés dérivent directement de celles du modèle d'accès alterné et sont applicables aux uniporteurs et aux transporteurs actifs secondaires (Harrison and Christensen, 1975).

Les transitions ou étapes qui relient chaque état du transporteur sont caractérisées par des constantes de vitesses qui définissent avec quelle vitesse (cinétique) la transition sera effectuée (**figure 9**) : dans l'exemple de la figure 7 qui est celui d'un uniporteur, k_1 et k_2 représentent respectivement les constantes cinétiques avec laquelle le substrat (S_1) se lie (CS_1) et se dissocie (C_1) du transporteur lorsque celui-ci est tourné vers le compartiment 1. k_5 et k_6 caractérisent les vitesses avec lesquelles le substrat se lie (CS_2) et se dissocie (C_2) du transporteur lorsque celui-ci est tourné vers le compartiment 2. k_3 et k_4 caractérisent les étapes « aller » et « retour » de transconformation du transporteur lorsque celui-ci est lié au substrat. Enfin k_7 et k_8 caractérisent les étapes de transconformation à vide du transporteur.

Dans une situation où le substrat n'est présent que d'un côté de la membrane (on parle alors de situation *zéro-trans*), un cycle de transport sera associé au passage stochastique mais progressif du transporteur dans les 4 états du cycle jusqu'au retour à l'étape initiale. Les 4 étapes du cycle sont donc la liaison du substrat au transporteur dans le compartiment *cis*, la transconformation du transporteur lié au substrat, la dissociation du substrat dans le compartiment *trans* et la transconformation à vide du transporteur vers le compartiment *cis*, c'est à dire la position initiale du cycle. Dans le cas présent, le transport net d'un cycle de transport sera donc d'une molécule. Le flux net d'un transport correspond au nombre de molécules transportées par unité de temps. Il est ainsi directement lié aux vitesses de transition entre les différentes étapes du transport. Comme ces étapes forment un cycle, la vitesse de transport sera dictée par la transition énergétiquement la plus défavorable, autrement dit la plus lente. On parle d'étape limitante.

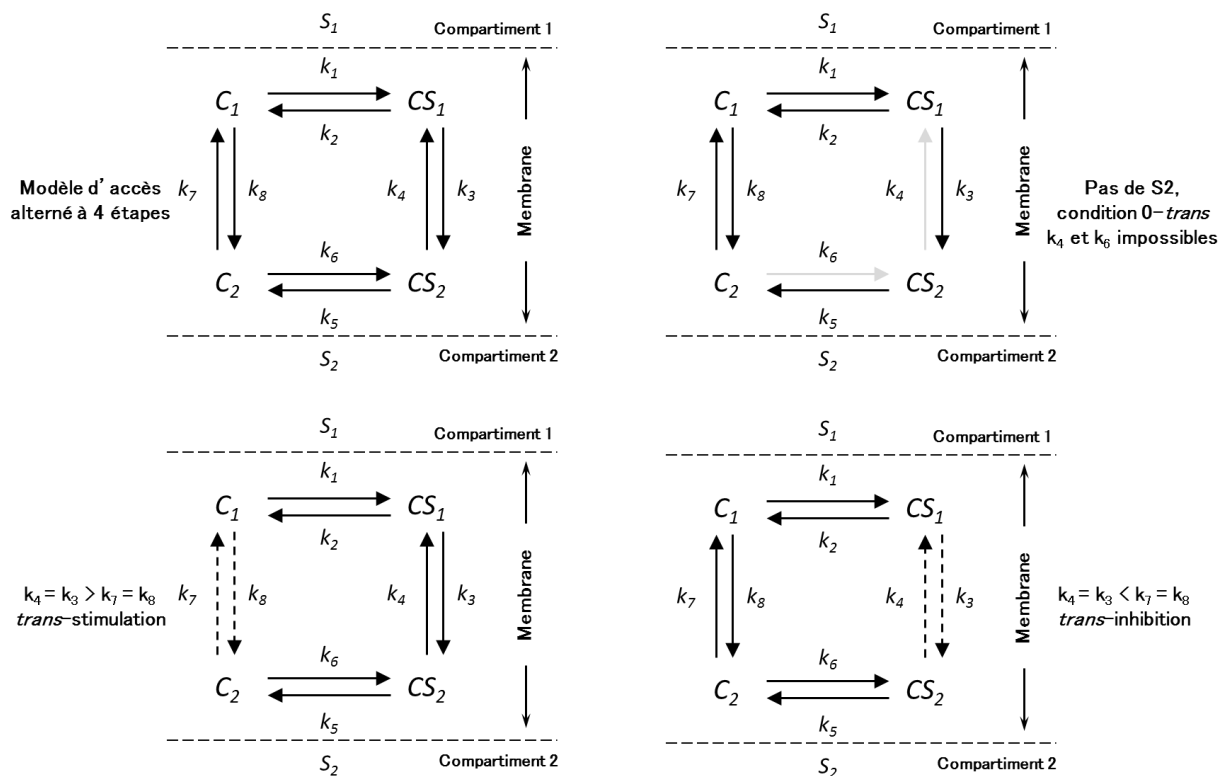


Figure 9 : Modélisation des concepts de *trans*-stimulation, de *trans*-inhibition, et de condition zéro-*trans*, à partir du concept d'accès alterné à 4 étapes.

En général, on considère que les étapes de liaison ou de dissociation du substrat avec son transporteur sont beaucoup plus rapides que celles de transconformation ($k_1, k_2, k_5, k_6 \gg k_3, k_4, k_7, k_8$). De plus, les étapes de transconformation entre deux états similaires se font souvent à une vitesse de même ordre ($k_3 \approx k_4$; $k_7 \approx k_8$). En fonction de l'identité de l'étape limitante, 3 conditions de transport sont possibles :

- 1- Si les transconformations à vide sont plus lentes que les transconformations dans l'état lié au substrat ($k_3 = k_4 < k_7 = k_8$), alors le transport d'un substrat du compartiment *cis* vers le compartiment *trans* sera accéléré par la présence du substrat dans le compartiment *trans*, réalisant un échange électroneutre. En effet, si le compartiment *trans* ne contient pas de substrat, alors un cycle net de transport ne pourra s'effectuer qu'en réalisant la séquence $k_1 \rightarrow k_3 \rightarrow k_5 \rightarrow k_7$. k_7 étant l'étape limitante de ce cycle, elle limitera le flux net du transport. La présence du substrat dans le compartiment *trans* rend possible le cycle de transport $k_1 \rightarrow k_3 \rightarrow k_4 \rightarrow k_2$. L'étape limitante est donc ici k_4 . Comme $k_4 > k_7$, ce cycle est plus rapide que le cycle précédent limité par k_7 . Le flux unidirectionnel du transport des substrats du compartiment *cis* vers le compartiment *trans* sera ainsi accéléré. On parle de ***trans*-stimulation**.
- 2- En faisant le même raisonnement, si les vitesses de transconformations à vide et dans un état lié au substrat sont de même ordre ($k_3 = k_4 = k_7 = k_8$), alors la séquence du cycle de

transport utilisant la transconformation à vide $k_1 \rightarrow k_3 \rightarrow k_5 \rightarrow k_7$ est aussi rapide que celle utilisant la transconformation lié $k_1 \rightarrow k_3 \rightarrow k_4 \rightarrow k_2$ pour le retour du transporteur vers le compartiment *cis*. La présence de substrat dans le compartiment *trans* n'affecte pas le flux de transport du substrat du compartiment *cis* vers le compartiment *trans*. Le transporteur n'est donc pas **trans-stimulable**.

- 3- Enfin, si les transconformations dans l'état lié au substrat sont plus lentes que les transconformations à vide ($k_3 = k_4 > k_7 = k_8$), alors le transport d'un substrat du compartiment *cis* vers le compartiment *trans* sera ralenti par la présence du substrat dans le compartiment *trans*. On parle de **trans-inhibition**.

Ces propriétés démontrées ici sur les transporteurs de type uniport montrent que la séparation entre les échangeurs (antiporteurs) et les uniporteurs n'est pas absolue. Un uniporteur fortement *trans*-stimulé peut ainsi apparaître comme un antiporteur préférentiel. D'autre part, le même raisonnement peut s'appliquer à des antiporteurs (au sens strict) et à des symporteurs. Donc, tout transporteur secondaire peut-être, ou non, *trans*-stimulable. Par contre, il est important de souligner que cette propriété ne peut pas se produire dans le cas d'un mécanisme de type canal.

2.2. Le transporteur lysosomal PQLC2

Chez l'Homme, le gène *PQLC2* est localisé sur l'extrémité du bras court du chromosome 1. Son identification en tant que transporteur lysosomal d'acides aminés cationiques (CAA) date de 2012 par la publication la même année de deux articles princeps utilisant deux approches différentes (Jézégou *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2012). Ces travaux apportaient une identité moléculaire à une activité de transport lysosomal de CAA, baptisé « système c » (Pisoni, Thoene and Christensen, 1985; Pisoni *et al.*, 1987). Ils montraient aussi que ce transporteur est également impliqué dans le traitement d'une maladie génétique rare associée à l'accumulation intralysosomale de cystine, la cystinose, par un médicament, la cystéamine.

Premières descriptions biochimiques : le « système c » de transport lysosomal d'acides aminés

Le « système c » (« c » pour « cationique ») a été découvert par une équipe de l'Université du Michigan dirigée par Halvor N. Christensen, au milieu des années quatre-vingt, comme étant la voie de transport lysosomal des acides aminés cationiques (Pisoni, Thoene and Christensen, 1985; Pisoni *et al.*, 1987). Ce système a été caractérisé par des approches biochimiques de flux d'acides aminés cationiques radiomarqués sur lysosomes purifiés de fibroblastes humains. L'analyse de l'efflux lysosomal de CAA radioactifs est rendu possible par l'utilisation d'esters de ces molécules radioactives pour charger artificiellement les lysosomes.

Cette utilisation est basée sur le principe suivant. Les groupements esters permettent aux acides aminés de traverser les membranes biologiques et sont déstabilisés dans les milieux acides. Or, les lysosomes sont des organites acides riches en estérases. Ainsi, une fois à l'intérieur des lysosomes, les groupements esters sont clivés et les CAA ne pourront ressortir que par les systèmes de transports présents dans la membrane du lysosome. On peut donc concentrer les CAA radioactifs à l'intérieur des lysosomes en les appliquant sous forme d'ester, et réaliser des cinétiques d'efflux. La modification du milieu d'incubation des lysosomes purifiés permet de tester différents paramètres susceptibles de modifier le transport des CAA. En incubant des lysosomes en présence de CAA radioactifs dans le milieu, et en analysant l'accumulation des CAA en fonction du temps, on peut également tester l'influx de CAA par les systèmes de transport de la membrane du lysosome, et l'effet d'une pré-charge des lysosomes réalisée à l'aide d'un ester non radioactif.

Ces expériences montrent que le système « c » est spécifique des CAA, d'où son nom. Il est stimulé par la température avec une valeur de Q^{10} proche de 2. Il est réversible et *trans*-stimulable dans les deux sens de flux par, au moins, l'arginine et la lysine. La présence de MgATP favorise l'efflux. Ceci peut s'expliquer par une stimulation de la V-ATPase qui se traduit par une acidification du lysosome et favorise ainsi la vitesse de transport du système. D'ailleurs, l'acidification du compartiment lysosomal stimule l'efflux. A l'inverse, l'acidification du compartiment cytosolique l'inhibe. Le transport est saturable par l'arginine (3mM). L'affinité du transport pour l'arginine est de 0.3mM et est environ 4x plus faible pour la lysine. Enfin, le système « c » n'est pas couplé au transport de sodium.

Identification de PQLC2

L'étude publiée par mon équipe (Jézégou *et al.*, 2012), en collaboration avec l'équipe dirigée par Bruno André de l'Université Libre de Bruxelles, a permis d'identifier 3 protéines de levure nommées Ypq1, Ypq2 et Ypq3. Ces protéines appartiennent à la famille des protéines à motif PQ. L'étude de ces protéines a montré qu'elles sont localisées à la membrane vacuolaire, qui correspond à la membrane lysosomale chez les animaux, et, sur la base de données génétiques, qu'elles sont impliquées dans l'homéostasie des acides aminés cationiques. Par ailleurs, mon équipe d'accueil avait identifié PQLC2 comme une autre protéine à motif PQ de la membrane lysosomale lors d'une étude protéomique en cours à cette époque (Chapel *et al.*, 2013). L'alignement des séquences des protéines PQ de la levure et de mammifère a révélé par la suite que PQLC2 est l'homologue des protéines Ypq1, 2 et 3.

L'analyse de sa localisation et la découverte de son motif d'adressage au lysosome ont permis de confirmer sa localisation. Le motif d'adressage comprend un motif dileucine (LL). Lorsqu'il est muté (LL/AA), PQLC2 est adressé à la membrane plasmique (**figure 10**). Ce mutant a été utilisé dans cette étude pour démontrer de manière directe le transport de CAA.

Quelques mois avant la publication de cet article, une autre étude avait identifié de manière indépendante PQLC2 (LAAT-1 chez *Caenorhabditis elegans*) comme étant le transporteur lysosomal

d'acides aminés cationiques (CAA) (Liu *et al.*, 2012). L'approche utilisée a consisté à isoler un mutant récessif d'un crible génétique basé sur l'identification d'embryons avec un nombre accru de corps apoptotiques chez *C. elegans*. Ce mutant, baptisé *laat-1*, se caractérisait par une augmentation du volume des lysosomes et une altération de l'activité de dégradation lysosomale des voies d'endocytose et d'autophagie (**figure 10**). La protéine de *C. elegans*, baptisée LAAT-1, possède deux motifs PQ et s'avère être en fait l'homologue de la protéine PQLC2 de mammifère. Sa fusion à la GFP indique une localisation lysosomale par un adressage dû à un motif dileucine dont la mutation provoque la délocalisation de la protéine à la membrane plasmique de la cellule. L'analyse biochimique du contenu des lysosomes purifiés chez les vers *laat-1* montrait une augmentation du contenu en lysine et en arginine d'un facteur 16 et 8 respectivement, l'histidine n'étant augmentée que d'un facteur 2. L'expression hétérologue de LAAT-1 ou de son homologue humain PQLC2 délocalisés à la membrane plasmique de cellules COS-7 a permis de confirmer l'activité de transport de ces deux protéines et leur sélectivité vis-à-vis des CAA.

Cette étude a également apporté des informations sur le rôle physiologique de LAAT-1. Les mutants *laat-1* sont viables, mais leur développement est retardé. L'analyse de la voie de signalisation GCN2 chez les vers mutants a permis d'expliquer l'origine de ce retard. Chez les eucaryotes, la détection d'une carence en acides aminés se traduit par l'activation d'une protéine kinase nommée GCN2, qui inhibe la synthèse protéique afin de conserver les réserves énergétiques de la cellule pour garantir sa survie. La synthèse protéique chez *laat-1* est inhibée. De plus, l'inactivation simultanée de LAAT-1 et de GCN2 chez *C. elegans* induit une mortalité partielle (<50 %) au cours du développement embryonnaire. Enfin, tous ces phénotypes sont corrigés par l'ajout d'une forte dose d'arginine et de lysine dans le milieu (100 mM pour chaque acide aminé). LAAT-1, et par extension probablement PQLC2, jouent donc un rôle dans l'apport nutritionnel à la cellule des CAA produit par le recyclage lysosomal pendant la phase de développement. Par contre, l'ajout de CAA exogène ne modifie pas le phénotype lysosomal observé sur *laat-1* (volume augmenté et activité de dégradation altéré). LAAT-1 est donc probablement impliqué dans des voies de régulation du lysosome.

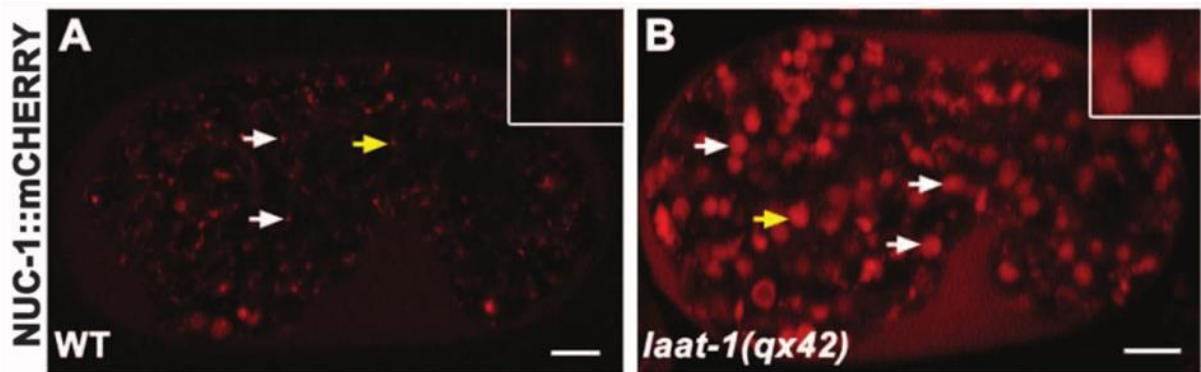
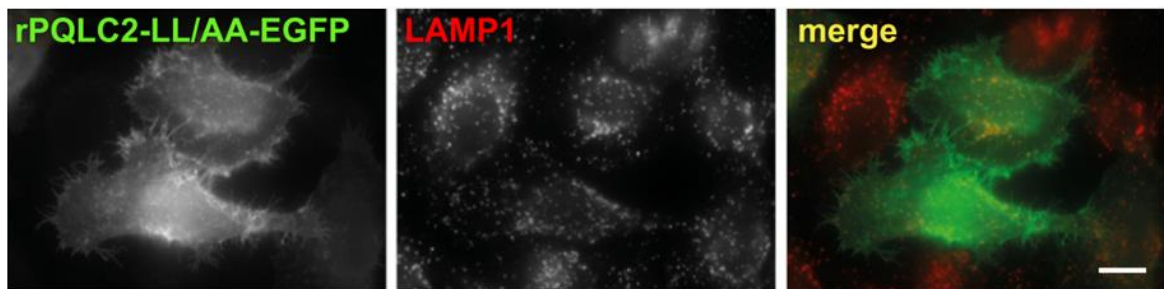
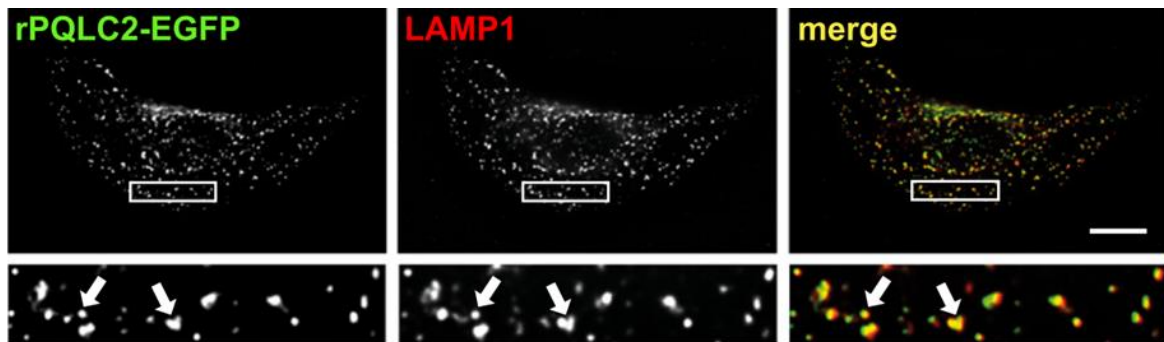


Figure 10 : PQLC2 est un transporteur lysosomal dont la déplétion provoque un élargissement des lysosomes chez *C. elegans*.

Haut : localisation de PQLC2 sauvage : la forme sauvage de PQLC2 de rat étiquetée avec l'EGFP (vert) transitoirement exprimé dans des cellules Hela colocalise avec un marqueur des lysosomes (LAMP1, rouge). La barre d'échelle est de 10 μm . Milieu : le mutant du motif d'adressage (LL/AA) de PQLC2 de rat étiqueté avec l'EGFP (vert) transitoirement exprimé dans des cellules Hela est exprimé à la membrane plasmique de la cellule. Ces images sont extraites de l'article Jézégou et al. 2012. Bas : La perte de l'orthologue de PQLC2 (*laa-1* qx42, « B ») est associée à une augmentation du volume des lysosomes caractéristiques des maladies de stockage lysosomal chez le ver *C. elegans*. NUC-1 est un marqueur des lysosomes. La barre d'échelle est de 5 μm . Ces images sont extraites de l'article Liu et al. 2012.

La superfamille structurale « SWEET/PQ-loop »

PQLC2 signifie « PQ-loop repeat containing 2 ». Cette protéine appartient à la famille des protéines à « boucle PQ » (PQ-loop), ou motif « PQ », dont le membre fondateur est la cystinosine. Cette famille est très mal caractérisée et posséderait une homologie lointaine avec les rhodopsines des micro-organismes (Zhai *et al.*, 2001). Elle possède ainsi une homologie lointaine mais établie de manière consensuelle avec des transporteurs de sucre, les protéines SWEET. Les protéines à motif PQ sont supposées posséder 7 domaines transmembranaires (TM) et se distinguent par la présence de deux motifs PQ comprenant l'association d'une proline avec une glutamine de manière extrêmement conservée (**figure 11**). Ces protéines se retrouvent majoritairement chez les eucaryotes.

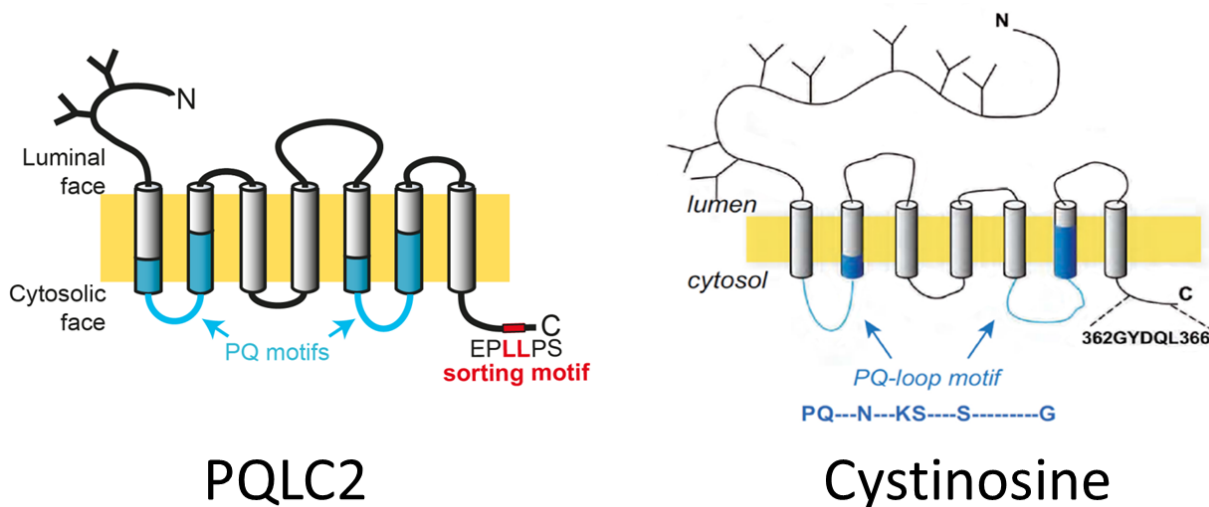


Figure 11 : Topologies prédites pour PQLC2 et la cystinosine, et emplacements des motifs PQ-loop.

Récemment, de nombreuses informations ont été apportées par la résolution des structures cristallines de transporteur membranaires possédant de fortes similarités avec les membres de la famille PQ-loop. Les premières structures concernent des transporteurs membranaires procaryotes dimériques, nommés Semi-SWEET, dont chaque monomère contient 3 TM arborant un unique motif PQ (Sun *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2015). La suivante concerne un transporteur membranaire de plante appartenant à la famille des SWEET, caractérisé par une topologie à 7TM et par la présence d'un motif dupliqué distinct du motif PQ, mais caractérisé aussi par une proline conservée (Tao *et al.*, 2015). Ces structures tridimensionnelles ont permis de mieux comprendre la structure inhérente à cette superfamille, que l'on peut désigner sous le terme de superfamille SPQ ([SWEET]-[PQ-loop]).

Cette superfamille se caractérise par l'association originale de deux ensembles de 3 TM de manière parallèle, et non de manière antiparallèle, comme c'est le cas pour la majorité des transporteurs secondaires. Chaque ensemble de 3 TM forme une unité appelé « faisceau de 3 hélices », THB (Three

Helix Bundle). Cette association permet de former un homodimère dans le cadre des protéines Semi-SWEET. Elle permet également de former une protéine à 7 TM par l'association au cours de l'évolution de deux THB répétés en tandem et reliés par un quatrième TM formant ainsi une topologie de type « 3+1+3 ». On retrouve cette topologie dans les protéines des familles SWEET et PQ-loop (**figure 12.A** ; Drew and Boudker 2016; Feng and Frommer 2016).

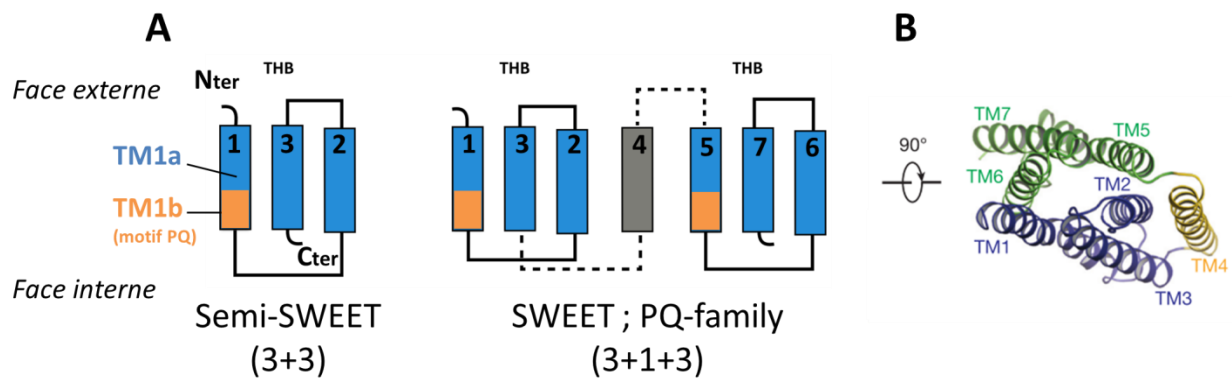


Figure 12 : La structure des protéines appartenant à la superfamille SPQ correspond à un assemblage de deux unités THB à trois domaines transmembranaires.

A) Topologie et propriétés des protéines de la superfamille SPQ. Une unité THB contient trois domaines transmembranaires. Le motif PQ apparaît dans le premier segment transmembranaire (TM1) de l'unité THB. Le TM1 contient ainsi deux domaines nommés TM1a et TM1b. Les transporteurs SWEET et appartenant à la famille PQ sont caractérisés par l'assemblage de deux domaines THB reliés par un segment transmembranaire (TM4). **B)** « Vue du dessus » d'un transporteur SWEET de plante montrant la disposition des différents TM les uns par rapport aux autres. D'après Tao Y et al. 2015.

Dans chaque THB, la position relative dans l'espace de chaque TM est de type TM1-TM3-TM2, le TM3 s'intercalant entre les TM1 et TM2 (**figure 12.A**). La structure cristallographique du SWEET de plante indique que le TM4 se positionne à proximité des TM2 et TM3 du premier THB, générant ainsi le domaine N-terminal du transporteur composé des TM1, TM2, TM3 et TM4. Le domaine C-terminal est composé des TM5, TM6 et TM7 (Feng and Frommer 2015; Tao et al. 2015 ; **figure 12.B**). Les extrémités N-terminales et C-terminales sont localisées respectivement dans le compartiment extracellulaire (équivalent à la lumière du lysosome) et dans le compartiment cytosolique. Pour chaque THB, le motif PQ, ou la proline du motif SWEET, débute au milieu du TM1 et introduit une cassure, séparant ainsi le TM1 en deux domaines, TM1a et TM1b. Dans ces protéines, chaque TM1a se plaque contre le TM2 de l'autre THB et stabilise ainsi l'association des deux THB (Drew and Boudker, 2016).

La cristallisation d'une protéine semi-SWEET en configuration ouverte vers l'extérieur et en configuration ouverte vers l'intérieur permet de proposer le mécanisme de transport du substrat par la superfamille SPQ (Lee *et al.*, 2015). Durant le mécanisme de transconformation, le dipeptide PQ

(TM1b) sert de charnière à TM1a qui suit alors le mouvement de l'autre THB. TM1b quant à lui suit le mouvement de son propre THB. Le substrat, dont le site de liaison est localisé entre les deux THB au milieu de la membrane, ne semble pas bouger pendant la transconformation. Le mouvement prédit des deux protomères est donc symétrique. Il se rapproche ainsi de celui d'une pince à linge (**figure 7** de la section destinée à les généralités sur les transporteurs secondaires ; **figure 13**). Le mécanisme général de transport proposé pour la famille SPQ suit donc le modèle de ROCKER-SWITCH.

En configuration ouverte vers l'intérieur, la chaîne latérale de la glutamine du motif PQ est libre. Le changement de conformation va la rapprocher du TM2 du THB partenaire et lui permet d'interagir avec un résidu du TM2. Cette interaction permet de stabiliser la conformation du transporteur ouverte vers l'extérieur (**figure 13**).

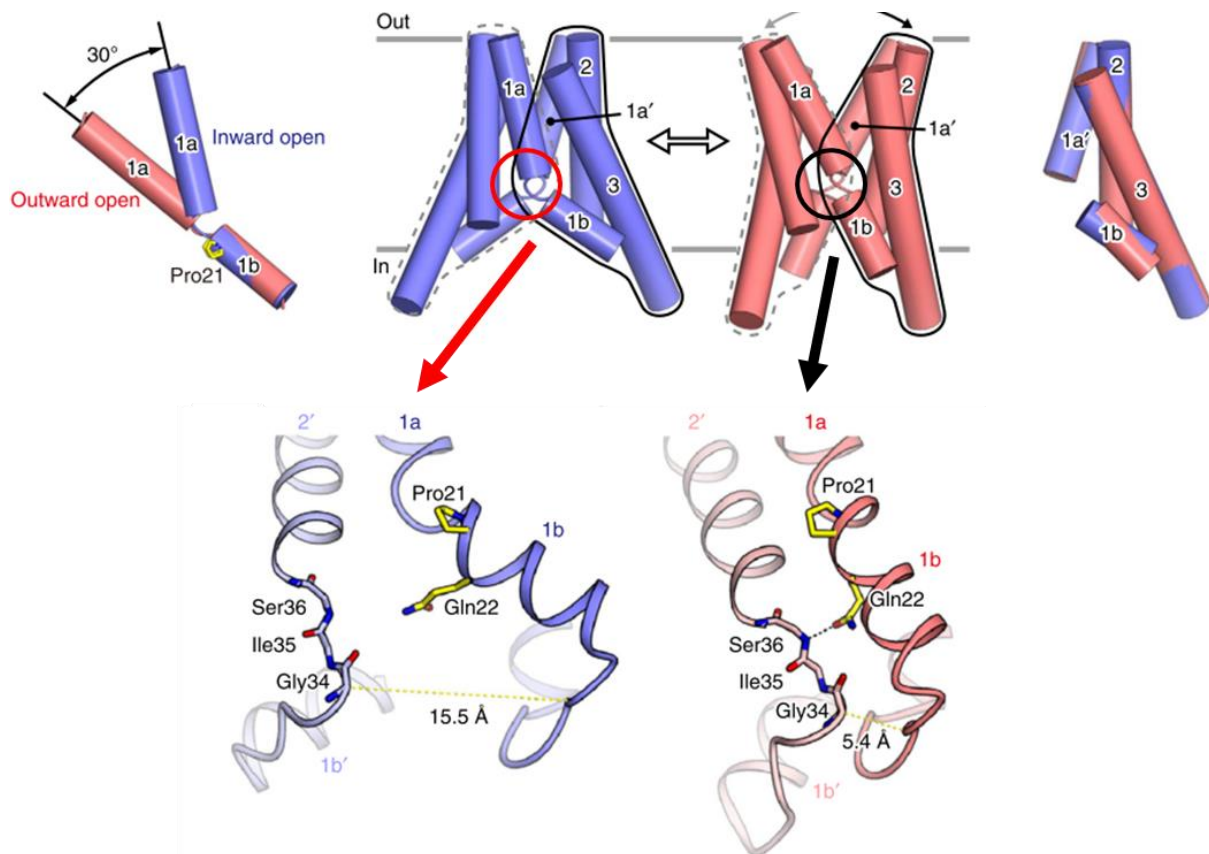


Figure 13 : Modèle de changement conformationnel des transporteurs de la superfamille SPQ, et rôle de charnière centrale du motif PQ-loop.

L'exemple présenté est celui d'un SemiSWEET organisé sous la forme d'un homodimère. Chaque monomère contient trois domaines transmembranaires (1, 2 et 3 pour le premier monomère, et 1', 2' et 3' pour le second). Le premier domaine transmembranaire de chaque monomère est cassé en deux sous-domaines par le motif PQ, nommés 1a et 1b. Le motif PQ permet de stabiliser la conformation ouverte vers l'extérieur. Le mécanisme suit le modèle de ROCKER-SWITCH.

Propriétés de transport de PQLC2

L'expression hétérologue d'un mutant de PQLC2 de rat dérouté à la membrane plasmique (LL/AA) dans des ovocytes de Xénopes a rendu possible l'étude de sa fonction de transport par l'utilisation de molécules radiomarquées et par la technique du potentiel imposé à deux électrodes (Jézégou *et al.*, 2012). Dans ce système, le milieu extracellulaire correspond topologiquement à la lumière du lysosome (le côté cytosolique reste cytosolique). Ainsi, ces travaux ont révélé que PQLC2 est un transporteur sélectif des acides aminés cationiques (arginine, lysine, histidine, ornithine ; **figure 14**). Il est activé à pH acide avec une activité optimale à pH < 5, il est électrogénique et il a une basse affinité pour ses substrats (Km proche de 2-3 mM pour l'arginine). Les premières tentatives d'étude du couplage ionique du transport avaient donné des résultats variables. Ce point avait donc été remis à une étude ultérieure.

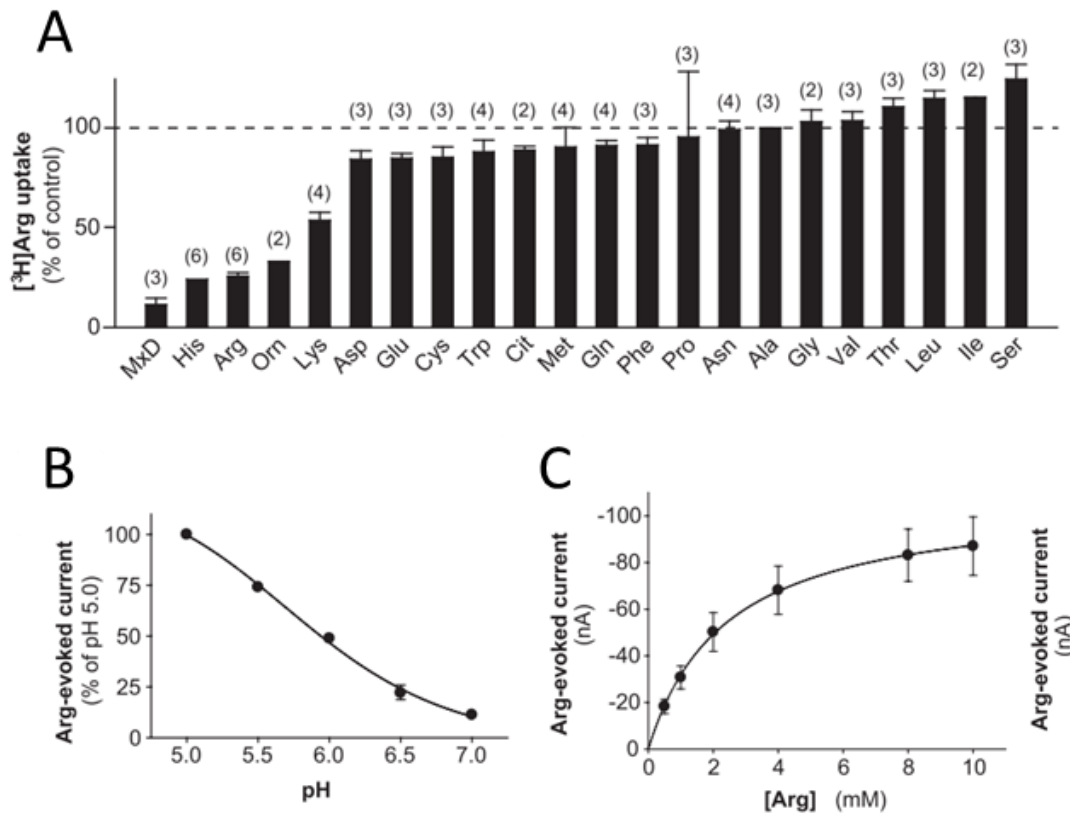


Figure 14 : PQLC2 est un transporteur d'acides aminés cationiques électrogénique, activé à pH acide, et de basse affinité.

Expériences de transport en biochimie (**A**) ou en potentiel imposé à deux électrodes (« **B** » et « **C** ») sur des ovocytes de Xénopes exprimant PQLC2 à sa membrane plasmique (mutant « LL/AA »). **A**. expérience de compétition de transport d'arginine tritiée (40 nM) en présence de différents acides aminés (10 mM). **B**) Evolution du courant de transport de l'Arg par PQLC2 en fonction du pH extracellulaire. **C**) Courbe de saturation du courant de transport d'Arg par PQLC2. Ces images sont extraites de l'article Jézégou et al. 2012.

Il faut bien différencier les résultats obtenus par les expériences de transport sur les lysosomes purifiés (système c) et dans les ovocytes de Xénopes exprimant PQLC2 à la membrane plasmique. Les propriétés de transport identifiées sont très semblables et il est clair que dans le cadre du traitement de la cystinose, le système c correspond à PQLC2 (ce point est développé dans la section suivante). Cependant, il existe certaines différences entre ces deux systèmes, comme par exemple les affinités pour les substrats, qui peuvent trouver leur origine dans la localisation de PQLC2 dans une membrane soit naturelle (lysosome), soit ectopique (membrane plasmique) dont la composition diffère. Ces différences peuvent affecter PQLC2 et ainsi modifier ses propriétés.

Depuis son identification, un seul article sur le PQLC2 de mammifère a été publié et est relatif à son mécanisme d'adressage (Llinares, Barry and André, 2015). Il indique que PQLC2 est probablement adressé au lysosome par la voie de la phosphatase alcaline (ALP), par le biais d'une interaction entre son motif d'adressage (motif dileucine) reconnu par le complexe AP-3. Les informations sur la régulation génétique, le mécanisme de transport, ou la fonction cellulaire de ce transporteur restent ainsi très restreintes.

Quelques études sur les trois homologues de PQLC2 chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, nommés Ypq1, Ypq2 et Ypq3 ont été publiées. Ypq1 est possiblement un transporteur vacuolaire de lysine, la vacuole étant l'équivalent du lysosome chez la levure (Sekito *et al.*, 2014). Ypq3 est possiblement un transporteur vacuolaire d'histidine (Manabe *et al.*, 2016). Ce dernier article obtient des résultats qui vont dans le sens d'un éventuel rôle de Ypq2, partagé avec Ypq1, dans le transport d'arginine.

2.3. Implication dans le traitement de la cystinose

La cystinose : généralités

La cystinose est une maladie génétique autosomale récessive due à la mutation du gène *CTNS* (17p13.2) codant pour le transporteur lysosomal de cystine, la cystinosine. Cette mutation a été décrite pour la première fois en 1903 par le biochimiste Suisse Emil Abderhalden et se caractérise par l'accumulation de cystine dans la lumière lysosomale sous forme de cristaux. Elle fait donc partie des maladies de stockage lysosomale (LSD).

En fonction du type de mutation de *CTNS*, on distingue 3 formes cliniques de cystinose. La forme néphropathique infantile, qui représente près de 95% des personnes cystinotiques, est la plus sévère et se caractérise par l'apparition, dès la première année de vie, du syndrome rénal de Fanconi, ou syndrome de Toni-Debré-Fanconi. La forme néphropathique juvénile est moins agressive. Les symptômes liés au syndrome de Fanconi apparaissent durant l'enfance, voire l'adolescence. Enfin, la forme non néphropathique oculaire se caractérise par l'apparition de symptômes liés à l'apparition de cristaux de cystine dans la cornée sans symptôme rénaux. Elle n'est généralement pas diagnostiquée avant l'âge adulte. Actuellement, on estime l'incidence de cette maladie à 1/100 000

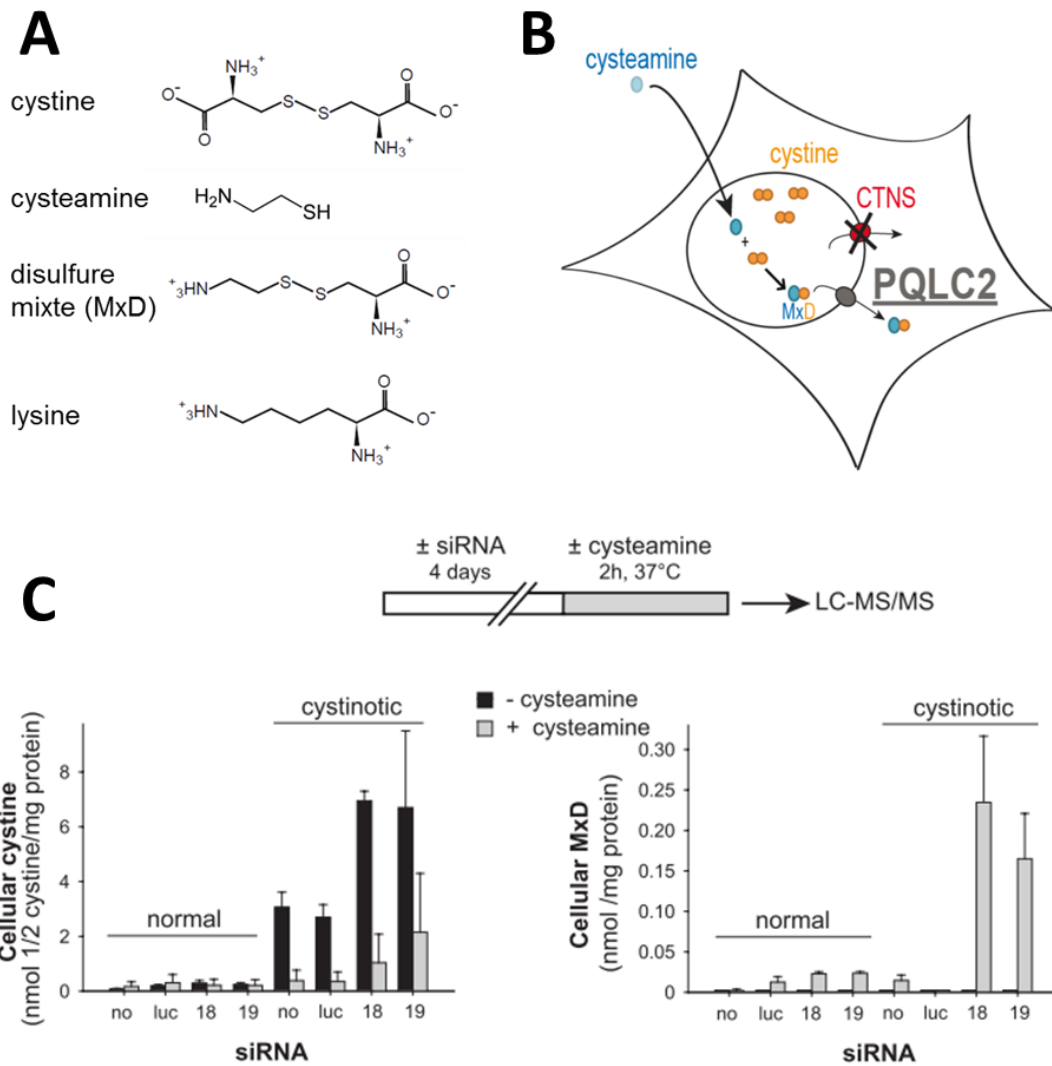
naissances. Il existe cependant de grandes disparités géographiques, avec une incidence particulièrement élevée en Bretagne (1/26 000).

Bien que la cystinosine soit une protéine ubiquitaire, les symptômes apparaissent à différents moments de la vie selon les organes. Le premier organe touché est le rein, qui est atteint dès l'âge de 4-6 mois par une tubulopathie (syndrome de Fanconi), à savoir, une dysfonction de la fonction de réabsorption de solutés de petite taille par le tubule proximal du rein. Cette dysfonction induit une polyurie, une polydipsie (soif excessive), des vomissements, une constipation, une déshydratation et un retard de croissance souvent associé à un rachitisme (problème osseux). Elle n'est pas une menace si elle est traitée (hydratation, suppléments en sels minéraux, hormones...). A l'âge de 10-12 ans, sans traitement médicamenteux, la tubulopathie se transforme en glomérulopathie, qui évolue vers une insuffisance rénale et la mort si aucune transplantation n'est effectuée. Petit à petit au cours de la vie, la plupart des organes sont affectés avec tout d'abord la thyroïde et les testicules, puis le foie et la rate, et enfin les muscles. Les fonctions cérébrales sont relativement peu affectées mais des troubles cognitifs apparaissent avec l'âge (mémoire, langage, fonctions intellectuelles...) (Emma *et al.*, 2014; Elmonem *et al.*, 2016).

Le traitement à la cystéamine et PQLC2

Il existe un traitement médicamenteux efficace pour la cystinose. Son origine date de l'observation d'un effet de déplétion de la cystine intracellulaire par des composés aminothiols en 1976 par le laboratoire de JA Schneider (Thoene, Oshima and Crawhall, 1976). Les nombreux efforts de recherche ont abouti en 1994 aux USA, et 1997 en Europe, au développement d'une thérapie médicamenteuse par la prise orale d'une molécule possédant un tel effet de déplétion de la cystine intracellulaire : la cystéamine (bêta-mercaptoéthylamine). Actuellement, cette thérapie médicamenteuse est la plus utilisée pour traiter la cystinose. Elle permet de ralentir l'apparition de l'insuffisance rénale de 6 à 10 ans et diminue la majorité des symptômes observés dans les autres organes.

Bien que la voie d'entrée de la cystéamine dans la cellule et dans le lysosome ne soit pas encore élucidée, l'effet de déplétion de la cystine lysosomale par la cystéamine est quant à lui relativement bien caractérisé depuis l'identification de PQLC2 (**figure 15**). Une fois dans la lumière du lysosome, la cystéamine réagit avec la cystine et la réduit pour former un composé disulfure mixte cystéine-cystéamine (MxD) et une molécule de cystéine. Une autre hypothèse, proposée par B. Gasnier, est que deux molécules de cystéamine réagissent avec une molécule de cystine pour former deux molécules de MxD. La structure chimique du MxD est très proche de celle de la lysine et est ainsi reconnue par PQLC2 qui l'exporte dans le cytoplasme.



Figure

15 : Mécanisme d'action de la cystéamine, et rôle de PQLC2 comme voie de sortie du lysosome du disulfure mixte cystéine-cystéamine.

A) Le disulfure mixte possède une structure chimique proche de la lysine, reconnue par PQLC2. **B)** Schéma du mode d'action de la cystéamine. **C)** Expériences de traitement par la cystéamine de fibroblastes immortalisés de patients cystinotiques suite à l'extinction, ou non, de PQLC2 par interférence d'ARN. L'extinction de PQLC2 limite l'action de la cystéamine. Figure extraite de l'article Jézégou et al. 2012.

Actuellement, la recherche clinique sur la cystinose dans le domaine de la thérapie génique est très active avec la création en 2007 du « Cystinosis Stem Cell and Gene Therapy Consortium ». La Cystinosis Research Foundation est une association de malade qui permet de financer de nombreux projets de recherche appliqués et fondamentaux portant sur la cystinose. Cette association a financé ma bourse de thèse et les recherches effectuées pendant ma thèse.

Une fois dans le cytoplasme, le MxD est réduit en cystéine et en cystéamine par le couple redox du glutathion [GSH/GSSG]. L'impact de cette réduction du MxD sur le métabolisme cellulaire n'est pas

encore clairement identifié. Cependant, il permet éventuellement à la cystéamine de rentrer à nouveau dans le lysosome et d'effectuer un nouveau cycle d'action sur la cystine intralysosomale. L'identification de PQLC2 comme voie de sortie du MxD du lysosome est récente et date de l'identification même de PQLC2 en 2012 (Jézégou *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2012).

Bien que le traitement par la cystéamine de la cystinose possède une efficacité rare par rapport aux autres traitements médicamenteux de maladies de stockage lysosomale, elle ne permet pas de corriger tous les symptômes et possède, comme tout médicament, des contraintes et des effets secondaires. Ainsi, ce médicament, nommé PROCYSBI®, approuvé en 2015, doit être pris par voie orale toute les 12h. Chez les enfants de moins de 2 ans, c'est l'ancienne formulation, nommée Cystagon®, qui est utilisée. Elle doit être prise toutes les 6h. Ces deux médicaments génèrent chez le malade une forte odeur persistante de soufre associée à une halitose (mauvaise haleine), qui entraînent souvent un défaut d'observance du traitement à l'adolescence. Chez les personnes présentant des cristaux de cystine au niveau de la cornée, l'application de gouttes pour les yeux concentrées en cystéamine doit être réalisée toute les heures. Les vomissements, diarrhées et ulcères sont fréquents. Enfin, la cystéamine ne fait que retarder l'apparition d'une insuffisance rénale et n'empêche pas la nécessité d'avoir recours avec le temps à la greffe de rein (Cherqui, 2012).

Le modèle murin de la cystinose

Le premier modèle murin délété (KO) pour le gène *Ctns* a été généré en 2002 sur un fond génétique mixte 129Sv x C57BL/6J par le groupe de Corinne Antignac à l'hôpital Necker (Cherqui *et al.*, 2002). Ce modèle présente une accumulation de cystine mais ne possède pas de complication rénale (**figure 16**).

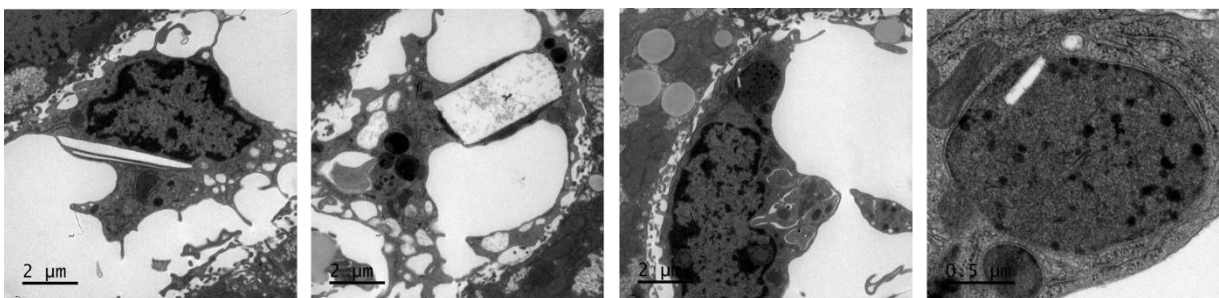


Figure 16 : Images de microscopie électronique des cristaux de cystine intracellulaire de cellules d'un modèle murin de cystinose.

Photos réalisées dans le cadre d'une collaboration de mon équipe d'accueil avec le Plateau technique « Imagerie Cellulaire & Moléculaire » de l'Université Paris Descartes dirigé par Bruno Saubaméa.

Par la suite, deux modèles KO *Ctns* sur fond génétique pur ont été sélectionnés, le modèle C57BL/6J et le modèle FVB/N, par le même groupe (Nevo *et al.*, 2010). A la différence du modèle de fond génétique mixte 129Sv x C57BL/6 et du modèle FVB/N, le modèle C57BL/6J présente, en plus d'un taux de cystine élevé dans le rein, une altération progressive du tubule proximal du rein. Ce modèle présente un problème de croissance (courbe de poids) associé à une atrophie musculaire, liée à une thermogénèse accrue des muscles et du tissu adipeux, et à un développement de tissu inguinal adipeux brun (Cheung *et al.*, 2016). La thyroïde est également affectée (Gaide Chevronnay *et al.*, 2015). Le problème de fertilité présent chez les hommes (azoospermie sécrétoire) n'est cependant pas retrouvé dans ce modèle, malgré la présence de cystine dans les testicules (Besouw *et al.*, 2012).

METHODES

1. Potentiel imposé à deux électrodes sur ovocyte de Xénope

1.1. Préparation des ovocytes de Xénope

Des sacs ovariens d'ovocytes de Xénope femelle (*Xenopus laevis*) sont prélevés sur animal anesthésié selon les règles du Comité d'Éthique en matière d'Expérimentation Animale Paris Descartes (autorisation CEEA34.BG.081.12). Les ovocytes sont individualisés et défolliculés par traitement enzymatique 1 h à 25 °C dans un milieu salin OR2 (85 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 5 mM Hepes-K⁺ ; pH ajusté à 7.6 par NaOH ou HCl) contenant de la collagénase de type II ou D (Gibco ou Roche, respectivement) à 2 mg/mL. Les ovocytes défolliculés sont maintenus à 19 °C dans un milieu salin BARTH (88 mM NaCl, 1 mM KCl, 2.4 mM NaHCO₃, 0.82 mM MgSO₄, 0.33 mM Ca(NO₃)₂, 0.41 mM CaCl₂, 10 mM Hepes-Na⁺ ; pH ajusté à 7.4 par NaOH ou HCl) contenant 50 µg/mL de gentamycine (Sigma).

Au minimum 12 h après leur préparation, les ovocytes sont injectés avec 50 ng d'ARNc *Pq1c2*-LL/AA-*Egfp* à l'aide d'un nano-injecteur (World Precision Instruments) (volume injecté : 50 nL). La séquence ainsi que la procédure d'obtention de ces ARNc est détaillé dans l'article (Jézégou *et al.*, 2012). Cet ARNc contient la séquence de *Pq1c2* de rat mutée au niveau du motif d'adressage au lysosome (LL/AA) et étiqueté en C-terminal avec la séquence de l'*Egfp*. Cette construction est ainsi déroutée à la membrane plasmique de l'ovocyte et visible sous microscope à fluorescence. Des œufs injectés avec 50 nL d'eau distillée servent de témoins négatifs. L'acidification du milieu externe permet de mimer l'environnement de la lumière lysosomale (**figure 17.A**). La face cytosolique est représentée par le cytosol de l'ovocyte et la face luminale est représentée par le milieu d'incubation acide de l'ovocyte.

24h après l'injection, l'expression de la protéine est estimée sous microscope à épifluorescence (Eclipse TE-2000, Nikon) (**figure 17.B**). Les ovocytes possédant le plus fort halo de fluorescence à la membrane plasmique sont privilégiés pour les expériences.

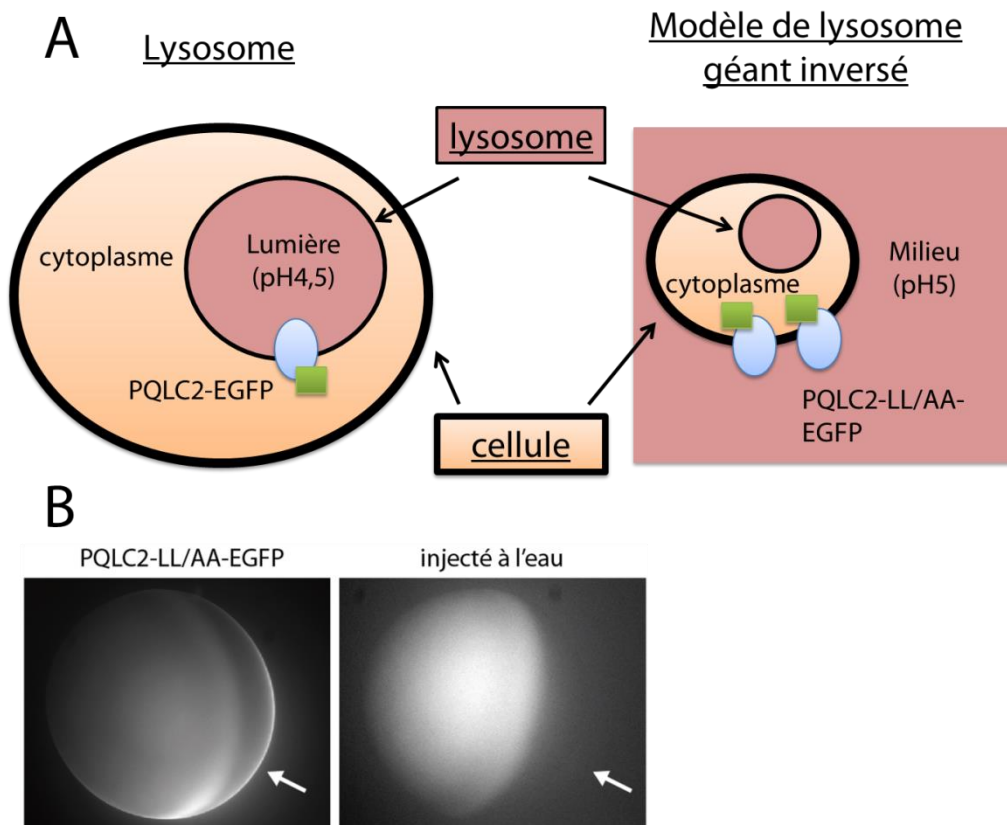


Figure 17 : Modèle de lysosome géant inversé sur ovocyte de Xénope.

A) PQLC2 muté dans sa séquence d'adressage (LL/AA) est délocalisé à la membrane plasmique de la cellule. L'environnement acide de la cellule permet de reproduire les conditions de la lumière du lysosome. **B)** Gauche : Image d'un ovocyte de Xénope exprimant PQLC2 étiqueté avec l'EGFP à la membrane plasmique. Droite : ovocyte contrôle, n'exprimant pas PQLC2. La flèche blanche indique la localisation de la fluorescence émise par PQLC2-LL/AA-EGFP. Taille de l'ovocyte : 1.1 mm. Photos prises à l'aide d'une caméra CCD (Coolsnap).

1.2. Principe du potentiel imposé à deux électrodes

Les mesures de courants en potentiel imposé sur ovocytes de Xénope sont réalisées à l'aide de la technique de potentiel imposé à deux électrodes (TEVC).

Les ovocytes sont empalés à l'aide de deux microélectrodes. Chaque microélectrode est composée d'un fil d'argent Ag/AgCl disposé dans un capillaire en borosilicate rempli d'une solution de KCl 3 M. Une électrode sert à mesurer le potentiel de membrane de l'ovocyte (électrode de potentiel, V) et l'autre sert à injecter du courant (électrode de courant, I). Ces deux électrodes, de résistance comprise entre 0.5-3 MΩ, sont reliées à un amplificateur 0725C (Warner Instrument). Deux électrodes de référence Ag/AgCl (une pour chaque électrode V et I) sont positionnées dans le bain proche de l'ovocyte. L'ensemble du système est relié à un digitaliseur (Digidata 1440A, Molecular Devices) qui permet le contrôle du système ainsi que l'enregistrement des mesures par ordinateur. L'expérimentateur peut ainsi choisir la valeur de potentiel à imposer à la membrane de l'ovocyte.

L'électrode de potentiel permet de mesurer en temps réel le potentiel de membrane de l'ovocyte. L'électrode de courant permet d'injecter une quantité de courant suffisamment grande pour modifier le potentiel de membrane de l'ovocyte. Ainsi, à chaque instant, l'électrode de courant permet d'ajuster le potentiel de membrane de l'ovocyte à celui souhaité par l'expérimentateur en injectant la quantité de courant nécessaire et suffisante pour atteindre ce potentiel.

Une fois les ovocytes empalés, le potentiel de membrane est immédiatement imposé à une valeur de -20 mV. D'une manière générale, 30 min sont nécessaires pour obtenir une intensité de courant stable permettant d'imposer ce potentiel. Par la suite, soit l'expérience se déroule à potentiel constant et il suffit uniquement d'appliquer le protocole de perfusion, soit elle est réalisée sur une gamme de potentiels donnés et nécessite alors l'utilisation d'un protocole spécifique.

Les expériences sont réalisées à température ambiante (20°C). Pour chaque ovocyte, le potentiel de membrane et la résistance des deux électrodes utilisées sont enregistrés. L'acquisition des enregistrements obtenus à potentiel constant utilise un filtre passe-bas à 10 Hz et une fréquence d'acquisition de 1000 Hz. Pour les expériences qui utilisent les sauts de potentiel, le filtre passe-bas est à 0.5 kHz et la fréquence d'acquisition à 5 kHz. Les données sont enregistrées et analysées par le logiciel pCLAMP 10 (Molecular Devices).

1.3. Solutions et molécules utilisées

Les ovocytes sont empalés dans une solution de ND100 (100 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1.8 mM CaCl₂ tamponné avec 5 mM de MES) ajustée à pH 5.00 à l'aide d'HCl concentré ou de NaOH.

Les molécules perfusées correspondent majoritairement aux substrats de PQLC2, à savoir les acides aminés cationiques arginine et lysine. L'histidine a été étudiée dans le cadre des expériences en patch clamp car son transport modifie les courants endogènes de l'ovocyte. PQLC2 est un transporteur de basse affinité avec un Km proche de 2 mM pour l'arginine (Jézégou *et al.*, 2012). Dans notre étude, nous avons majoritairement travaillé à des concentrations saturantes pour PQLC2 de 20 mM. Comme les acides aminés cationiques sont ajoutés au milieu ND100 sous forme de sel monohydrochloride (Arg-Cl, Lys-Cl ; Sigma), deux phénomènes importants sont à prendre en compte. D'une part la modification de la pression osmotique du milieu. Le ND100 possède une osmolarité proche de 200 mOsm. L'ajout de 40 mOsm n'est donc pas négligeable. D'autre part, les électrodes de références sont composées de chlorure d'argent directement en contact avec la solution perfusée. L'état métastable d'échange entre les ions chlorures de la solution et les ions chlorures de l'électrode est donc sensible aux variations de concentration en ions chlorures de la solution. Celle du ND100 est proche de 105 mM. L'ajout de 20 mM d'ions chlorures est donc à nouveau non négligeable et va modifier le signal électrique enregistré. Pour pallier ces deux problèmes, nous avons choisi de compléter le milieu de référence ND100 pH 5.00 avec 20 mM de NMDG-Cl (N-Methyl-D-glucamin, Sigma). Dans nos conditions d'expérience, cette molécule n'a pas d'effet mesurable sur les courants endogène de l'ovocyte. Cette astuce permet donc de travailler à osmolarité et à concentration en

ions chlorures constantes. Dans certaines conditions, la concentration en ions chlorures de la solution contrôle et de solutions tests sont différentes, un pont salin composé de KCl 1.5 M et d'agar-agar à 2 % a alors été utilisé.

1.4. Protocole de détermination du ratio charge-substrat

Les courants membranaires d'ovocytes exprimant PQLC2 à leur membrane plasmique (PQLC2-LL/AA-EGFP) sont enregistrés à l'aide d'un système TEVC en présence de L-[2,3,4-³H]arginine-Cl (Perkin-Elmer) diluée dans 3 mM d'Arg-Cl. L'arginine est ensuite lavée par du milieu pH 5.0, puis par du milieu pH 7.5 (le MES est remplacé par de l'HEPES à concentration équivalente, soit 5 mM). Le pH alcalin permet de bloquer l'activité de PQLC2 (Jézégou *et al.*, 2012). Les ovocytes sont alors désempalés, lavés 4 fois par immersion dans un puits contenant du milieu pH 7.5 glacé, puis transférés et lysés dans un tube à scintillation contenant 300 µL de soude 0.1 N (1 ovocyte par tube). L'arginine tritiée contenu dans chaque ovocyte est comptée à l'aide d'un compteur à scintillation (Tri-Carb 2100 TR, Packard) après ajout de liquide à scintillation. La quantité de charges électriques couplées au transport de l'arginine par PQLC2 est calculée par intégration de l'aire du courant enregistré. Avec ces deux valeurs, on peut donc calculer le rapport charge-substrat du transport médié par PQLC2.

1.5. Protocole d'étude du couplage de PQLC2 aux protons

Les ovocytes exprimant PQLC2 sont injectés avec 25 nL d'une solution aqueuse saturée par une sonde fluorescente sensible au pH, le BCECF, au minimum 30 min avant le début de l'expérience. Ils sont ensuite déposés dans un système de TEVC particulier permettant de stimuler et d'enregistrer les signaux émis par le BCECF (Zdebik *et al.*, 2008).

Le BCECF présent dans les ovocytes est excité à 488 nm par une LED située à proximité de l'ovocyte. L'intensité de fluorescence émise par la sonde est filtrée par une bande aux longueurs d'ondes 512-565 nm et convertie en courant par une photodiode disposée sous une lentille dans la chambre de perfusion. Le signal de fluorescence est converti en signal électrique à l'aide d'une interface USB-6221 (National Instruments).

Ces mesures ne sont pas ratiométriques, c'est-à-dire qu'elles ne permettent pas de déterminer si l'évolution du signal est liée à une altération de la sonde elle-même (fuite, photoblanchiment, décalage progressif de la zone d'émission enregistrée...) ou à une modification de son état d'énergie associé dans notre cas à une modification du pH.

L'ovocyte est perfusé à l'aide d'une solution contenant 100m M Na⁺-gluconate, 2 mM MgSO₄, 2 mM K⁺-gluconate, 5 mM MES, pH 6.0 ajusté à l'aide de NaOH. L'arginine (Arg-Cl) est ajoutée à hauteur de 5 mM et l'histidine (His-Cl) à 10 mM. L'utilisation de ces deux concentrations respectives permet

d'obtenir des amplitudes de courant de transport voisines. Les électrodes de références sont reliées à la cuve de perfusion par l'intermédiaire d'un pont salin composé d'agar et de KCl 3 M.

Le substrat est ensuite lavé jusqu'au retour à la ligne de base du niveau de courant. L'acquisition des données est réalisée par le système WinWCP (Strathclyde Electrophysiology Software). Le courant de transport est enregistré à l'aide d'un filtre passe-bas à 5 Hz. Le signal de fluorescence est filtré à 0.3 Hz. Les enregistrements sont analysés par le logiciel pCLAMP.

1.6. Protocole de sauts de potentiel

Pour analyser la dépendance au potentiel de PQLC2, un protocole de sauts de potentiels allant de +100 mV à -100 mV par pas de -20 mV a été utilisé (**figure 18**). Chaque créneau de potentiel, d'une durée de 180 ms, est précédé et suivi d'un bref saut de potentiel de 100 ms à -40 mV. Un intervalle de 120 ms à -20mV existe entre chaque saut à -40mV.

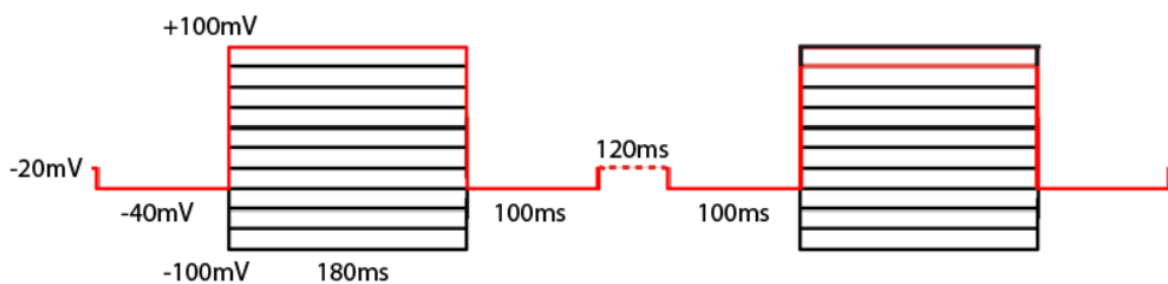


Figure 18 : Protocole de sauts de potentiel sur ovocyte de Xénope.

Ce protocole comprend une succession de sauts de potentiel comprenant un socle de sauts brefs compris entre -20 mV et -40 mV encadrant un saut de potentiel dont la valeur décroît progressivement avec la progression du protocole. La valeur de départ de ce saut est +100 mV (ligne rouge). Chaque cycle fait décroître cette valeur de -20 mV. Ce cycle se termine lorsque la valeur de potentiel -100 mV est testée. Ce schéma présente les valeurs de potentiel imposé des deux premiers cycle du protocole (+100 et +80 mV).

Ce protocole de sauts de potentiel est appliqué à l'ovocyte toutes les 20 secondes. Le protocole de perfusion de substrats commence lorsque les courants mesurés aux différents potentiels sont stables sur une durée minimale d'une minute. Les résultats bruts d'une expérience correspondent donc à un ensemble de fichier décalés de 20s dans le temps et contenant les courants enregistrés pour un jeu de potentiels allant de +100 à -100mV. Un écran électrique relié à la masse est positionné entre l'électrode I et l'électrode V et permet d'éviter que les courants injectés par I altèrent le potentiel mesuré par V.

1.7. Solutions spécifiques de l'étude du couplage de PQLC2 aux ions Na^+ , K^+ , H^+ et Cl^-

La substitution des ions nécessaires pour la réalisation de cette expérience a nécessité de modifier les solutions classiquement perfusées.

Les solutions pH 6.0 ont été obtenues par ajout de 1.5 mM de NDMG (Sigma). La modification de l'osmolarité de la solution est négligeable.

Le contenu en ions Na^+ et NMDG^+ est respectivement 42 mM et 20 mM pour la solution avec ajout d'ions potassiums et de 42 mM et 78 mM pour la solution contrôle. L'osmolarité des deux solutions est identique.

Concernant les expériences de substitution des ions chlorures, le Na-Cl (100 mM) a été remplacé par du Na-Gluconate (Sigma). La solution en Lysine 20 mM possède 129 mM de chlore. Les solutions de référence possèdent 2 mM de NMDG-Cl. Le pH des solutions pauvres en ions chlorures a été ajusté à 5.00 par l'ajout de MES (29 mM) à la place de l'HCl. L'osmolarité des solutions est de : 207 mOsm (solutions contrôles), 240 mOsm (solution contrôles avec 20 mM de lysine-Cl), 230 mOsm (solutions substituées). Un pont salin composé de 1.5 M KCl et 2 % agar-agar a été utilisé. Malgré le pont salin, un décalage compris entre -6 et -8 mV est observé en passant de la solution contrôle à la solution substituée en ions chlorures. Une correction de +6 mV a donc été apportée au potentiel d'inversion mesuré dans la condition [2 mM Lys ; 10 mM Cl].

2. Patch-clamp sur HEK293T

2.1. Préparation des cellules HEK293T

Des cellules HEK293T sont transfectées par lipofection (lipofectamine 2000, Thermofisher) avec le plasmide modifié pEGFP-N1 (Clontech) dont la séquence est détaillée dans l'article : (Jézégou *et al.*, 2012). Ce plasmide contient la même séquence de *Pqlc2* que celle des ARNc injectés dans les ovocytes de Xénopes (*Pqlc*-LL/AA-*Egfp*). Après 24 h d'expression, les cellules transfectées sont décollées et ensemencées dans des boîtes Falcon de 35 mm recouvertes de poly-D-lysine (0.05 mg/mL, Sigma) à hauteur de 150,000 cellules par boîte. Ce repiquage est important car il permet d'isoler les cellules les unes des autres en évitant ainsi leur couplage électrique par jonctions gap. Ces jonctions peuvent affecter les mesures de courant enregistrées en patch clamp. Les expériences de patch clamp commencent 4h après le repiquage des cellules, temps nécessaire pour que les cellules adhèrent au fond de la boîte.

Le taux de transfection (60-70 %) et le niveau d'expression des cellules sont contrôlés sous microscope à fluorescence (**figure 19**).

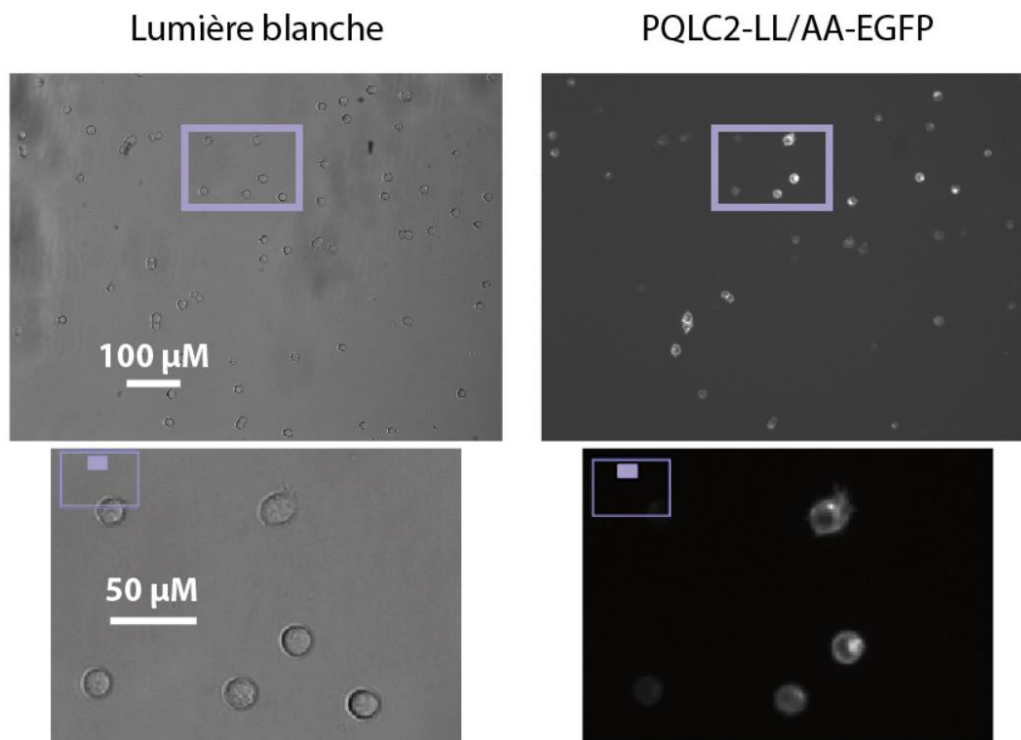


Figure 19 : Taux de transfection et niveau d'expression de Pqlc2-LL/AA-EGFP dans les cellules HEK293T.

En haut à gauche : champ d'observation en lumière blanche permettant de visualiser l'ensemble des cellules ayant suivi le protocole de transfection. En haut à droite : champ d'observation identique mais cette fois-ci ne révélant que les cellules exprimant PQLC2-LL/AA-EGFP. Cette observation est rendu possible par l'utilisation d'un filtre d'émission à 465-495 nm et d'excitation à 515-555 nm spécifique de la détection de l'EGFP. Les images du dessous représentent un agrandissement de la zone démarquée par le rectangle violet apparaissant sur le champ d'observation. La fluorescence émise par l'étiquette EGFP, donc par extension PQLC2, est localisée à la membrane plasmique des cellules.

2.2. Expériences de patch-clamp en configuration « cellule entière »

Le poste de patch clamp est pourvu d'un microscope et d'une LED qui permettent la sélection pour l'expérience de patch clamp des cellules qui expriment fortement PQLC2 à la membrane plasmique. Les cellules qui n'expriment pas PQLC2 servent de témoins négatifs.

Le milieu nutritif des cellules (DMEM + GlutaMAX, 10 % SVF, 1 % Penicillin-Streptomycin ; GIBCO) est remplacé par une solution externe (mentionnée par la suite sous le terme « milieu de référence ») contenant 130 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 20 mM glucose, 20 mM MES, 20 mM NMDG-Cl ; pH 5.00 ajusté avec NaOH ou HCl ; 315-330 mOsm. La boîte est installée dans le poste de patch de Jacsue Kehoe, directrice de recherche dans le laboratoire Brain Physiology (CNRS UMR 8118). Le système de perfusion est détaillé dans l'article : (Blarre *et al.*, 2014). Ce système permet

d'échanger à l'échelle de la seconde le milieu dans lequel baigne la cellule patchée. Il est pourvu d'une tête de perfusion positionnée à une centaine de microns de la cellule (**figure 20**).

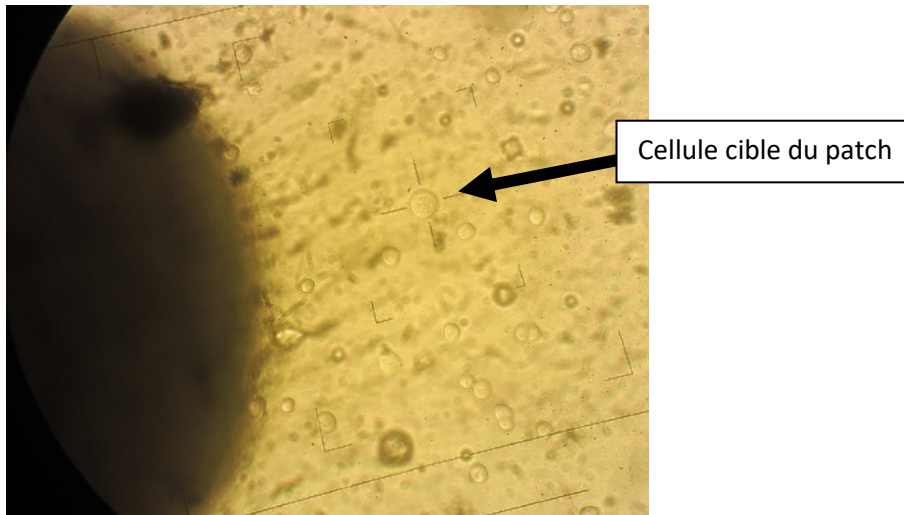


Figure 20 : Position relative de la tête de perfusion par rapport à la cellule patchée.

La masse sombre observée à gauche de l'image correspond à la tête de perfusion.

La cellule patchée est perfusée en continu à l'aide de la tête de perfusion. La perfusion se fait d'abord avec le milieu de référence puis, une fois la stabilité électrique de la cellule obtenue, avec les solutions propres à l'expérience. Le changement de voie de perfusion se fait par le biais de valves contrôlées par ordinateur et permet d'appliquer pendant quelques secondes le substrat à tester. Pour les expériences en patch clamp, je n'ai testé que des solutions contenant 20 mM Arg-Cl, 20 mM Lys-Cl ou 20 mM His-Cl (Sigma). Ces solutions sont identiques au milieu de référence à ceci près que le substrat à tester est substitué au NMDG-Cl. Entre deux cellules patchées, le milieu de référence est renouvelé.

L'approche de patch consiste à accoler puis à rompre localement la membrane de la cellule à l'aide d'une microélectrode Ag/AgCl disposée dans un capillaire en borosilicate rempli d'une solution contenant 130 mM CsCl, 10 mM Hepes, 10 mM EGTA, 2 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂; pH 7,35-7,4 ajusté à l'aide de KOH ou HCl ; 295-305 mOsm. On obtient une configuration appelée cellule-entière où le contenu de la pipette est directement en contact avec le cytoplasme de la cellule. Trois solutions mères intrapipettes ont été réalisées en additionnant 20 mM NMDG-Cl, 20 mM Arg-Cl ou 20 mM Lys-Cl à la solution de base. Ces solutions ont été aliquotées et stockées à -20 °C. L'électrode, de résistance 3-4 MΩ, permet de mesurer et d'imposer le potentiel de la cellule par application d'un courant généré par un amplificateur EPC-9 (HEKA Elektronik). Une électrode de référence Ag/AgCl est reliée physiquement au bain par un pont salin. Il contient le milieu de référence auquel sont ajoutés 3M KCl et 2% d'agar-agar. L'ensemble du système est relié à un digitaliseur qui permet le

contrôle et l'enregistrement des mesures par ordinateur. L'expérimentateur peut ainsi choisir la valeur de potentiel à imposer à la cellule et enregistrer en temps réel ses courants membranaires.

2.3. Protocole de rampe de potentiels

A l'aide de la technique de patch clamp en configuration cellule entière, nous avons choisi d'étudier la dépendance au potentiel des courants de transport des CAA par PQLC2. Pour cela, un protocole de rampe de potentiels a été mis au point. Ce protocole est réalisé sur des cellules dont le potentiel est préalablement imposé à -40 mV. Il consiste à appliquer un bref pulse de 30 ms à -100 mV permettant de charger la capacité électrique de la membrane de la cellule, suivi d'une rampe de 400 ms allant de -100 mV à +100 mV. Le potentiel de membrane est alors ramené à la valeur de repos de -40 mV (figure 5).

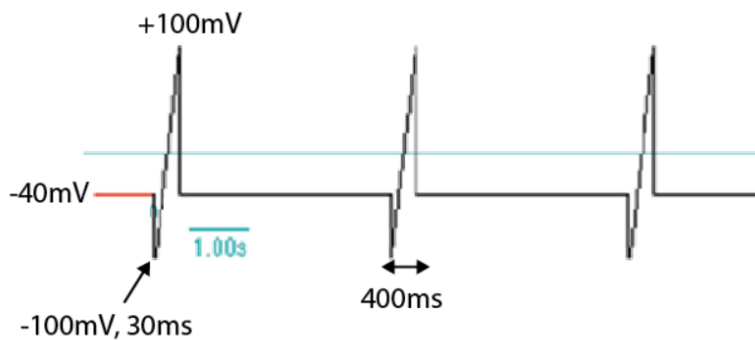


Figure 21 : Protocole de rampe de potentiels.

Ce protocole montre trois rampes de potentiels réalisées à intervalle régulier. Chaque rampe permet de balayer de manière continue une gamme de potentiel allant de -100 mV à +100 mV.

Comme ce protocole est très rapide et que le système de perfusion permet un échange des solutions qui baignent la cellule de l'ordre de la seconde, nous avons automatisé et systématisé un protocole plus complexe alliant des changements du milieu perfusé et des rampes de potentiels. Ce protocole permet l'étude du transport de plusieurs substrats en une seule séquence.

2.4. Protocole appliqué à une cellule venant d'être patchée

Tout d'abord, la capacité membranaire de la cellule est estimée par l'application de deux échelons successifs et opposés de 10mV d'amplitude (**Figure 22.A**). Pour une condition donnée, plus la taille

de la cellule sera grande et plus l'aire des pics de courant mesurés lors du changement de potentiel sera grande. Cette aire doit être constante sur un même enregistrement indépendamment du sens de la variation du potentiel. La présence d'un courant résistif de grande amplitude est signe d'une jonction entre l'électrode et la membrane de la cellule de mauvaise qualité (fuite électrique).

Ensuite, des rampes de potentiels par groupe de 3 sont réalisées afin de s'assurer de la stabilité des courants membranaires dans le milieu de référence (**Figure 21**).

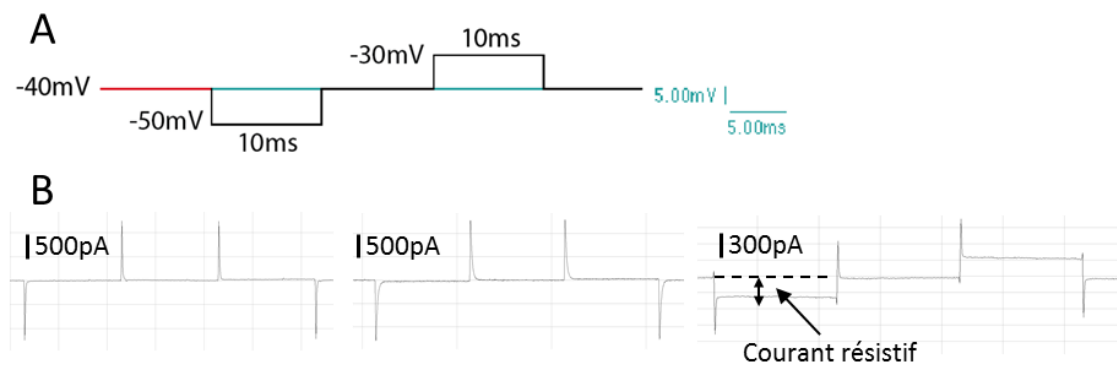


Figure 22 : Détermination de la capacité membranaire et de la qualité du patch.

A) Protocole de potentiels imposés. **B)** Traces des courants capacitifs de trois cellules. La flèche noire montre un courant capacitif. La cellule de droite est de petite taille. L'aire du courant capacitif de l'enregistrement de gauche est plus faible que celle du milieu. La taille de la cellule du milieu est plus grande. A droite, la jonction entre la cellule et l'électrode et la membrane de la cellule est de mauvaise qualité, d'où la présence d'une fuite électrique (courant résistif).

Enfin, lorsque toutes ces étapes sont validées, signe de la bonne qualité de la jonction pipette-membrane et de l'intégrité de la membrane de la cellule, le protocole alliant perfusions de substrats et rampes de potentiels est appliqué (**figure 23**). Ce protocole permet d'encadrer une rampe de potentiels effectuée pendant l'application d'un substrat par deux rampes réalisées dans le milieu de référence. La rampe pré-application sert de référence et, par comparaison avec la rampe post-application, permet de vérifier la stabilité du patch durant la réalisation du protocole de perfusion. Comme le logiciel de commande permet de programmer plusieurs séquences de perfusion, nous avons décidé d'inclure 4 séquences d'application de substrat sur un même protocole. La durée de ce protocole est de 52s.

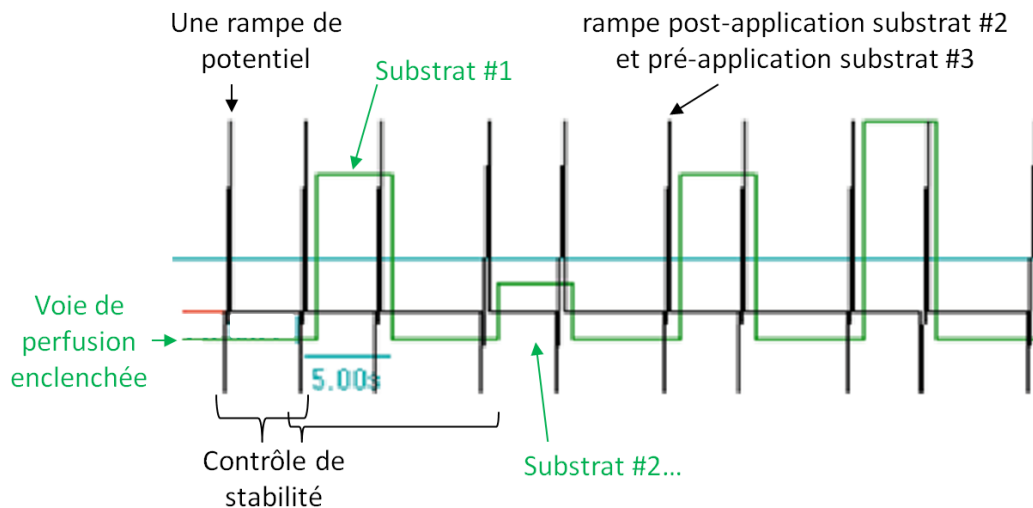


Figure 23 : Protocole automatisé alliant la perfusion de plusieurs substrats et la réalisation de plusieurs rampes de potentiels sur une même séquence (durée du protocole : 52 secondes).

Les expériences sont réalisées à température ambiante (20 °C). Pour chaque cellule patchée, la résistance de la pipette, la résistance série (elle permet d'estimer la qualité de la continuité électrique entre le milieu intrapipette et le cytoplasme de la cellule qui peut, par exemple, être partiellement obstrué par un agrégat), la capacité de la membrane (proportionnelle à la taille de la cellule) et la résistance membranaire (qui comprend la résistance à l'origine du courant résistif) sont évaluées. Les cellules ayant une résistance membranaire inférieure à 0.3 GΩ n'ont pas été retenues pour analyse. La fréquence d'acquisition des enregistrements est de 5 kHz. Les données sont enregistrées par le logiciel Patchmaster (HEKA) et analysées par le logiciel pCLAMP 10 (Molecular Devices).

3. Modèles murins

3.1. *Souris utilisées*

L'utilisation des souris a été réalisée selon les règles du Comité d'Éthique en matière d'Expérimentation Animale Paris Descartes (autorisation CEEA34.CAL.088.12).

Plusieurs fonds génétiques de souris ont été utilisés dans cette étude. Les souris chimériques porteuses de la mutation $Pq1c2^{tm1(KOMP)Vlcg}$ ont un fond génétique chimérique C57BL/6N - BALB/c. La lignée de souris KO $Pq1c2$ est de fond génétique C57BL/6N. La lignée de souris KO $Ctns$ nous a été

gracieusement transmise par Corinne Antignac. Elle est faite sur un fond génétique C57BL/6J. La lignée *Pqlc2-Ctns* est ainsi de fond génétique mixte C57BL/6N - C57BL/6J.

Ces souris sont élevées dans l'animalerie du Centre Universitaire des Saints-Pères. Les conditions d'élevage se font sous un cycle jour-nuit de 12h à une température de 23 °C. Les litières sont composées de rafle de maïs.

3.2. Construction des souris chimériques

La délétion de *Pqlc2* (projet VG11557) s'est faite par recombinaison homologue en utilisant l'approche VelociGene sur des cellules souches embryonnaires (cellules ES) de souris de fond génétique C57BL/6N. L'approche VelociGene (Valenzuela et al. 2003), développée en 2003 par Regeneron Pharmaceuticals se base sur l'utilisation de chromosomes artificiels de bactérie comme vecteur de recombinaison. Ces vecteurs permettent, entre autres particularités, la délétion de séquences génomiques de grandes tailles (>70kb), tout en rendant possible l'introduction d'un gène rapporteur, ce qui permet l'étude du pattern d'expression du gène muté. Elle a permis la production en série de nombreuses cellules ES recombinées KO pour un gène donné.

Dans notre cas, la cassette utilisée pour remplacer le gène *Pqlc2* est la cassette nommée ZEN-UB1 (**figure 24**). Elle comprend le gène rapporteur de la β-galactosidase (*lacZ*) suivie du gène de sélection codant pour la néomycine (*neo*), lui-même flanqué de deux sites *loxP*. Ces sites permettent, une fois le modèle murin KO obtenu, d'exciser le gène de sélection, car il est susceptible d'interférer avec le phénotype induit par la délétion du gène étudié. La cassette possède une taille de 6084pb. La délétion est constitutive, ce n'est pas un KO-conditionnel.

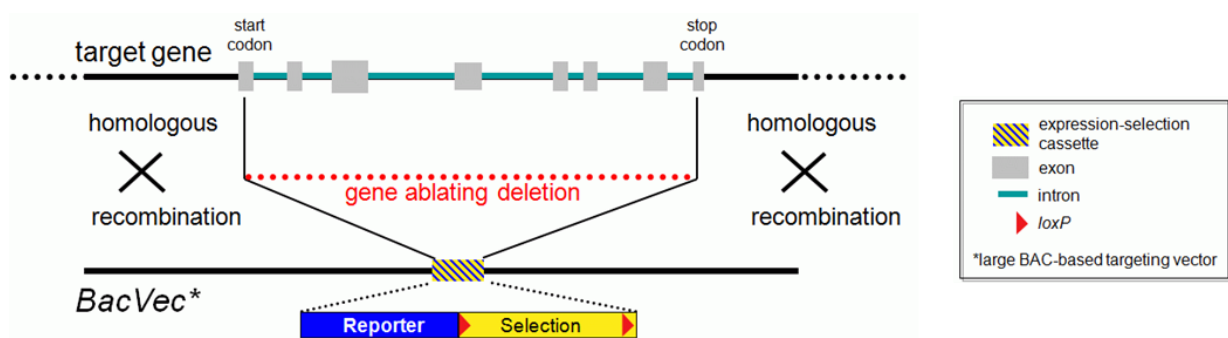


Figure 24 : Schéma de l'approche de délétion par recombinaison homologue VelociGene.

3.3. Amorces utilisées pour la validation de l'inactivation du gène *Pqlc2*.

Paire d'amorces	Amorce	Orientation	Séquence
set 1	F7	sens	AAGCCTGTGAAACCCGAGAG
	R2	antisens	TTAAGCTGCCCTACTGTGCC
set 1'	F7	sens	AAGCCTGTGAAACCCGAGAG
	R1	antisens	GACGACAGTATCGGCCTCAG
set 2	A4	sens	CGACTACCCATTTCAGTTTCC
	B3	antisens	CCACTGGGACTCTCCAAATG
set 2'	A1	sens	GCAGCCTCTGTTCCACATACACTTCA
	B3	antisens	CCACTGGGACTCTCCAAATG
set 3	mPQLC2-F1	sens	ATTATGTCCTGGCCGACCTG
	mPQLC2-R1	antisens	CTTGGGTTGACTGCCGTATG

Tableau 1 : Informations sur les amorces utilisées pour la validation de l'inactivation du gène *Pqlc2*.

La détermination exacte de la position de la délétion en 5' a été réalisée par séquençage en utilisant les amplicons de PCR obtenus à partir des amorces F7 et R1 localisées respectivement sur le gène *Pqlc2* et sur la cassette ZEN-UB1. Le couple d'amorce F7 et R2 permet d'amplifier l'allèle sauvage.

La détermination exacte de la position de la délétion en 3' a été réalisée par séquençage en utilisant les amplicons de PCR obtenus à partir des amorces A1 et B3 localisée respectivement sur la cassette ZEN-UB1 et sur le gène *Pqlc2*. Le couple d'amorce A4 et B3 permet d'amplifier l'allèle sauvage. Le primer A1 correspond au primer Reg-NeoF du site KOMP.

Les amorces mPQLC2-F1 et mPQLC2-R1 s'hybrident respectivement sur l'EXON 5 et l'EXON 8 du gène *Pqlc2* murin. Elles permettent de détecter la présence du transcrite de *Pqlc2* chez la souris sauvage.

3.4. Protocole d'analyse des ARNm de *Pqlc2*

Les ARN totaux de 2 souris sauvages et 2 souris KO ont été purifiés à partir de 30mg de rein ou de foie. Les ARN ont été purifiés puis extraits à l'aide du Kit RNeasy développé par Qiagen. Une étape de transcription inverse permet de générer les ADNc des ARN extraits (Kit QuantiTect Reverse Transcription de QIAGEN). Enfin, une PCR est réalisée sur les ADNc en utilisant un couple d'amorces, nommées mPQLC2-F1 (sens) et mPQLC2-R1 (antisens), qui s'hybrident respectivement sur l'EXON 5 et l'EXON 8 du gène *Pqlc2* murin.

3.5. Protocole de prélèvement et d'analyse du contenu en métabolites du plasma sanguin suite à un jeûne alimentaire

Le protocole utilisé est adapté de l'étude de Ezaki J, et al. (Ezaki *et al.*, 2011). Les membres inférieurs des souris sont tout d'abord dépilés. Le lendemain, les souris sont déposées dans une nouvelle cage ne comprenant qu'une litière composée de rafle de maïs et un accès à l'eau (mise à jeûn). 24h plus tard, on leur donne accès à de la nourriture pendant deux heures. A la fin de ces deux heures, environ 20µL de sang sont prélevés au niveau de l'artère fémorale d'une des deux jambes à l'aide d'une aiguille et d'un tube récolteur hépariné (échantillon avant-jeûne). 24h plus tard, un nouveau prélèvement de sang (20µL) est réalisé au niveau de la jambe non lésée (échantillon pendant-jeûne). La souris est alors sacrifiée. Le sang chaud venant d'être prélevé est immédiatement mis à centrifuger 5min à 2000g à température ambiante. Le plasma (surnageant) est alors prélevé et mélangé à 5volumes de méthanol glacé. L'aliquot est homogénéisé et stocké à -20°C. La transparence du plasma est gage de qualité car sinon une couleur rosée apparaît, signe de la contamination du contenu plasmatique par celui du contenu des globules rouges lysés.

Le fait de réaliser une première période de mise à jeûn (24h) et de réintroduire de la nourriture sur une courte période permet de gommer les éventuelles différences de prises alimentaires précédant le démarrage du protocole. Cela permet de diminuer la variabilité des résultats au sein d'un même groupe. Durant toutes ces étapes, la souris est pesée afin de s'assurer que chaque souris répond d'une manière semblable au protocole (prise alimentaire, étape de prélèvement de sang mal supportée...).

Les échantillons plasmatiques sont analysés par GC/MS-TOF à la plateforme Métabolisme Métabolome de l'IFR87. J'ai participé au prélèvement et à la préparation des échantillons, et à l'analyse des spectres obtenus à la plateforme sous la responsabilité de Françoise Gilard. Cette étude a été réalisée sur deux groupes de 4 souris mâles KO et WT appariés de 10-10,5mois. Les prélèvements de sang ont été effectués le matin à 10h. Les résultats sont présentés sous la forme d'histogrammes des moyennes obtenus pour chaque condition (WT, KO, avant jeûne (a), pendant jeûne (p), figure 63). Un des échantillons contenant le plasma d'une souris KO avant jeûne (KOa) n'a pas pu être analysé.

3.6. Modèles de transmission génétique utilisés

Les modèles de létalité font intervenir une létalité partielle très élevée avec une pénétrance de 9999/10000. Cela permet d'homogénéiser la p value des différents tests statistiques du chi² de conformité qui ne tolère pas que les effectifs théoriques soient nuls. Cette approche a été préférée à des modèles de létalité possédant des pénétrances de 100% qui nécessite un ajustement du degré de liberté du test du chi² en fonction du modèle. Ainsi, pour chaque expérience, les degrés de liberté de

l'ensemble des tests sont identiques. L'utilisation d'une pénétrance plus élevée (>9999/10000) ne modifierait pas les p values.

La comparaison des effectifs observés aux effectifs des modèles théoriques a été réalisée par l'utilisation d'un test de χ^2 de conformité.

CHAPITRE 1 : ETUDE MECANISTIQUE DE PQLC2

Le but de mes recherches à l'échelle moléculaire de PQLC2 est de comprendre son mécanisme de transport.

D'une manière générale, l'analyse du mécanisme de transport des transporteurs membranaires permet de mettre à jour des propriétés susceptibles d'éclairer la fonction physiologique à laquelle ils participent. Elle permet également de mieux comprendre les relations structure-fonction, qui sont souvent applicables à d'autres transporteurs de la même famille structurale. Enfin, dans le cas de PQLC2, la découverte de paramètres influençant son activité de transport permettra peut-être d'améliorer le traitement de la cystinose par la cystéamine.

Dans un premier temps, j'ai étudié le couplage ionique du transporteur. Ce résultat m'a amené à caractériser sa dépendance au potentiel et a révélé un phénomène inattendu étudié dans ce chapitre.

1. Etude du couplage ionique de PQLC2 : approche par mesure de flux

L'étude publiée par mon équipe d'accueil sur l'identification et la caractérisation moléculaire de PQLC2 n'avait pas permis de déterminer ses propriétés de couplage ionique (Jézégou *et al.*, 2012). Les mesures de rapport charge-substrat du transport donnaient des valeurs variables selon le lot d'ovocyte utilisé. Le poste de TEVC que j'utilise est différent de celui de cette étude. Je ne réalise un enregistrement que sur un seul ovocyte à la fois. Cela me donne un meilleur contrôle et suivi individuel de chaque ovocyte. Le protocole de perfusion a également été modifié afin de limiter l'éventuelle vidange de l'ovocyte lorsque celui-ci doit être extrait du poste de TEVC pour lyse. Le premier objectif de ma thèse a donc été de caractériser le couplage ionique de PQLC2.

1.1. Mesure du rapport charge-substrat de PQLC2

L'objectif de cette expérience est de déterminer le nombre net de charges électriques associées au transport d'une molécule d'arginine par PQLC2. La valeur de rapport charge-substrat obtenue donne une information indirecte sur le couplage ionique du transporteur. Pour la cystinosine, il est de +1 (1 H⁺ transporté par molécule zwitterionique de cystine (Ruivo *et al.*, 2012)). Si le transport d'arginine

par PQLC2 est également couplé à un proton, le rapport mesuré sera de +2 car la molécule d'arginine porte une charge positive.

Les courants membranaires d'ovocytes exprimant PQLC2 à leur membrane plasmique (PQLC2-LL/AA-EGFP) sont enregistrés à l'aide d'un système TEVC en présence d'arginine tritiée (voir le chapitre « Méthodes ». A la fin de l'expérience, l'arginine tritiée contenu dans chaque ovocyte est comptée et la quantité de charges électriques couplées au transport de l'arginine par PQLC2 est calculée par intégration de l'aire du courant enregistré. Avec ces deux valeurs, on peut donc calculer le rapport charge-substrat du transport médié par PQLC2.

L'utilisation de durées variables de perfusion d'arginine permet de faire varier le nombre de molécules d'arginines accumulées ainsi que le nombre de charges transportées, et ainsi de corrélérer ces deux mesures. Des ovocytes injectés avec 50 nL d'eau distillée servent de contrôle pour estimer le transport endogène d'arginine et le signal électrique non spécifique éventuellement associé. Le potentiel de membrane imposé est de -40 mV. Quatre lots d'ovocytes provenant de quatre Xénopes différents ont été utilisés. Les résultats obtenus sont présentés en **figure 25**.

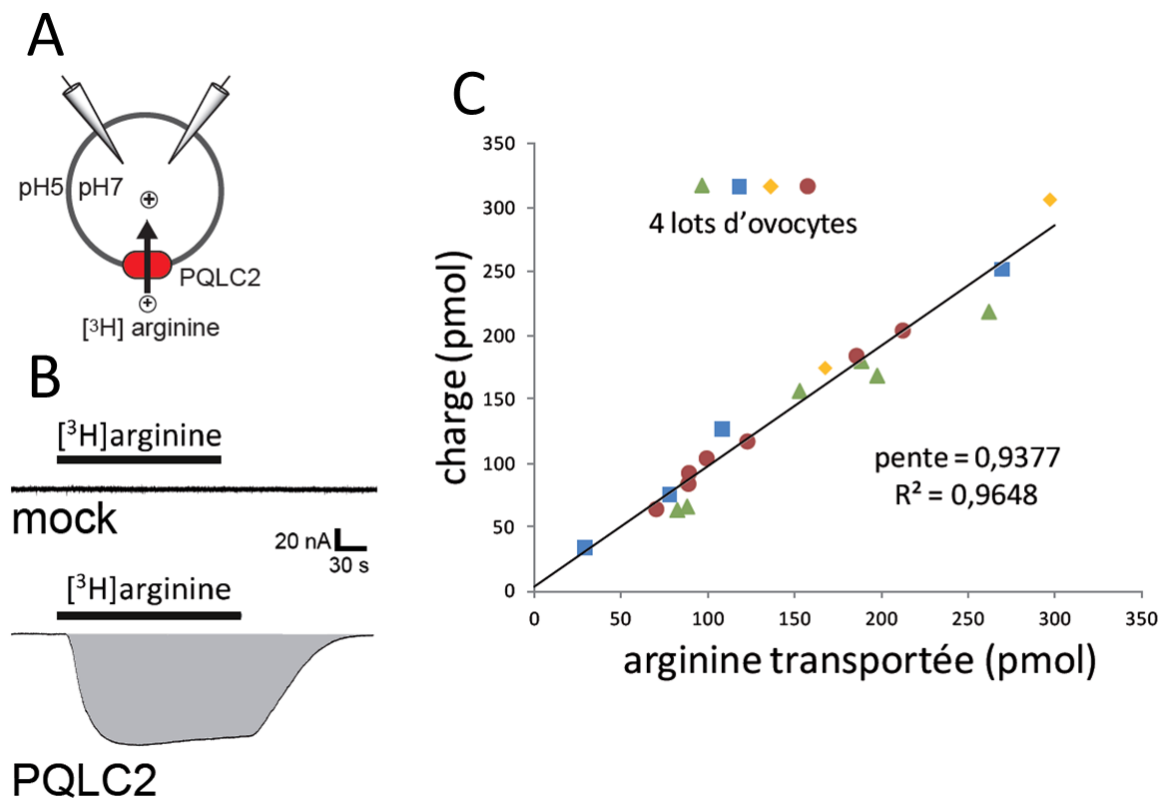


Figure 25 : Détermination du rapport charge-substrat de PQLC2.

A) Protocole de mesure du rapport charge substrat en TEVC. **B)** Traces de courants associées à l'application d'arginine enregistrées à -40 mV sur un ovocyte qui n'exprime pas (haut) ou qui exprime (bas) PQLC2. La partie grisée correspond, après intégration, à la quantité de charges électriques accumulées. **C)** Graphique représentant le nombre de charges électriques du courant de transport enregistrées en fonction du nombre de molécules d'arginine transportées dans des ovocytes PQLC2. Chaque point représente un ovocyte.

L'énorme avantage de cette approche est que les courants endogènes de l'ovocyte évoqués par l'arginine sont nuls comparés au courant de transport de PQLC2 (**figure 25.B**). Le nombre de charges électriques déterminé d'après les traces de courants sur un ovocyte PQLC2 ne nécessite donc pas de correction. L'arginine tritiée est également très peu transportée par les transporteurs endogènes de l'ovocyte (12 ± 3 pmoles ; $n=12$). Cette valeur a été estimée pour chaque lot d'ovocyte et a été soustraite des valeurs obtenues sur les ovocytes PQLC2 du même lot.

On observe une très bonne corrélation linéaire entre le nombre de molécules d'arginine et le nombre de charges accumulées par les ovocytes PQLC2 (**figure 25.C**). La pente de la droite obtenue est proche de 1. Le rapport charge-substrat de PQLC2 est donc d'une charge positive par molécule d'arginine.

Ces résultats n'excluent pas un couplage ionique complexe de PQLC2 avec les protons et un ou plusieurs autres ions dont les charges se compensent, comme par exemple le transport d'une molécule d'arginine couplée à l'entrée d'un proton et d'un ion chlorure (rapport charge substrat de +1). Cependant, l'hypothèse la plus simple pour expliquer ces résultats est que PQLC2 ne soit pas couplé aux protons, contrairement à la majorité des transporteurs du lysosome, ni à d'autres ions, c'est-à-dire qu'il fonctionne selon un mécanisme d'uniport.

1.2. Etude du couplage de PQLC2 aux protons

Afin d'examiner directement le couplage du cycle de transport de PQLC2 aux protons, nous avons décidé de mesurer l'acidification de l'ovocyte lors du transport d'acide aminé cationique (CAA) par PQLC2. Ce travail a été réalisé à l'University College London, dans l'équipe du Dr. Anselm A. Zdebick car il possède un montage approprié pour ce type de mesure. Les expériences ont été réalisées par l'étudiante en Master of Science Yan Li.

Cette approche consiste à mesurer l'évolution du pH intracellulaire associée au transport d'arginine ou d'histidine par PQLC2 présent à la membrane plasmique d'ovocytes dont on contrôle le potentiel à l'aide d'un système TEVC, et qui contiennent une sonde fluorescente sensible au pH, le BCECF. Une baisse de la fluorescence émise par cette sonde correspond à une acidification du contenu de l'ovocyte.

Le potentiel de membrane de l'ovocyte est imposé à -40 mV. Lorsque les signaux d'émission de fluorescence et de courants sont stables (ligne de base), l'arginine, puis l'histidine sont perfusés. Pendant l'application de ces molécules, le potentiel est hyperpolarisé à -100 mV pendant 30 s. Cette astuce permet d'accélérer PQLC2 et de corrélérer l'activité du transport à l'acidification de l'ovocyte. Les données de fluorescence sont normalisées par rapport au niveau de fluorescence initiale du début de l'expérience. Les résultats sont présentés en **figure 26**.

La fluorescence émise baisse légèrement avec le temps. Cette dérive peut être due au photoblanchiment du BCEF et à sa diffusion hors de l'ovocyte. Cependant, cette baisse est constante dans le temps et génère une ligne de base à pente négative relativement stable. L'application d'arginine à -40 mV n'affecte pas l'émission de fluorescence et c'est encore le cas quand PQLC2 est accéléré à -100 mV. Son transport n'est donc pas couplé aux protons.

Le transport de l'histidine sert de référence de sensibilité du système de mesure. En effet son transport par PQLC2 la fait passer d'un milieu acide (milieu de perfusion, pH 6.0) à un milieu neutre (cytoplasme, pH 7.1). Comme le pKa de l'histidine est de 6.0, elle se déprotonne quand elle atteint le cytoplasme. Cette acidification est associée à une baisse d'émission de fluorescence accrue (acidification) qui est amplifiée lorsque le transport de l'histidine par PQLC2 est accéléré (passage de -40 mV à -100 mV). Cette expérience démontre ainsi clairement que le transport médié par PQLC2 n'est pas couplé au transport de protons, le proton de l'histidine étant porté par le substrat et non par le transporteur.

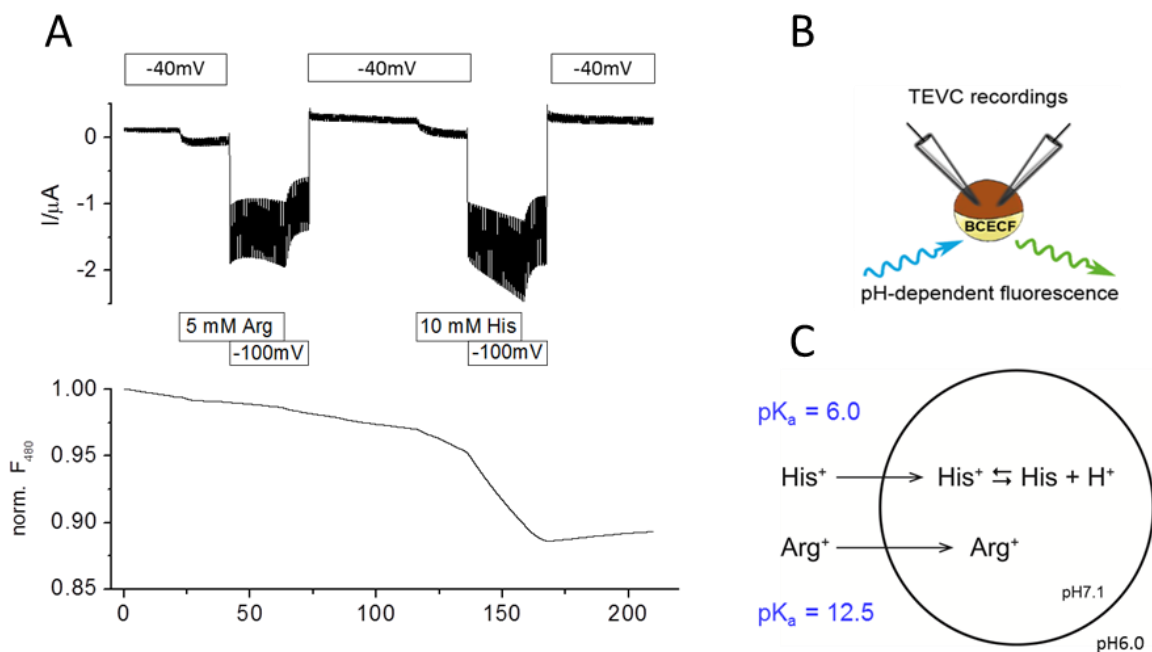


Figure 26 : Détermination du couplage de PQLC2 aux protons.

A) Traces de courant (haut) et de fluorescence (bas) associées au transport d'arginine et d'histidine par PQLC2. Ces mesures sont réalisées aux valeurs de potentiel de membrane -40 mV et -100 mV. **B)** Schéma du montage utilisé pour réaliser les enregistrements. **C)** Schéma d'interprétation des résultats.

2. La dépendance au potentiel de PQLC2 est inhabituelle aux potentiels positifs

2.1. Mise en évidence du phénomène de « courant paradoxal »

PQLC2 est électrogénique et n'est pas couplé au transport de protons. Il doit donc être fortement influencé par le potentiel de membrane puisqu'il s'agit a priori de la seule force motrice du transport malgré l'imposition d'un gradient de deux unités pH dans nos expériences pour mimer l'environnement lysosomal. Nous avons donc étudié la dépendance au potentiel du transport de l'arginine sur une gamme allant de +100 mV à -100 mV.

Le protocole de sauts de potentiel est décrit dans le chapitre « Méthodes ». Il est appliqué avant perfusion de l'arginine et au plateau du courant de transport d'arginine à une concentration donnée. Dans les ovocytes PQLC2, en soustrayant les traces de courants obtenues avant application (courants endogènes) aux traces obtenues pendant l'application d'arginine (courants endogènes + courants de transport d'arginine médié par PQLC2), nous obtenons les courants évoqués par le transport d'arginine par PQLC2 (**figure 27.A**). En l'absence d'inhibiteur connu de PQLC2, il s'agit de la seule méthode disponible pour isoler le courant porté par PQLC2 des courants endogènes. L'application de ce protocole sur des œufs injectés par de l'eau au lieu de l'ARNc de PQLC2-LL/AA-EGFP montre que les courants endogènes sont insensibles à l'arginine quelle que soit la concentration utilisée.

En rinçant l'arginine et en s'assurant du retour à la stabilité électrique de l'ovocyte, on peut tester une nouvelle concentration d'arginine. Ce protocole est appliqué sur un même ovocyte pour une gamme de concentrations contenant 0.25 mM, 0.5 mM, 1 mM, 2 mM, 5 mM et 10 mM d'arginine. Les courbes représentant le courant de transport évoqué par l'arginine (soustractions des signaux avant application d'arginine aux signaux pendant application d'arginine) en fonction du potentiel (courbes I-V) sont présentées en **figure 27.B**.

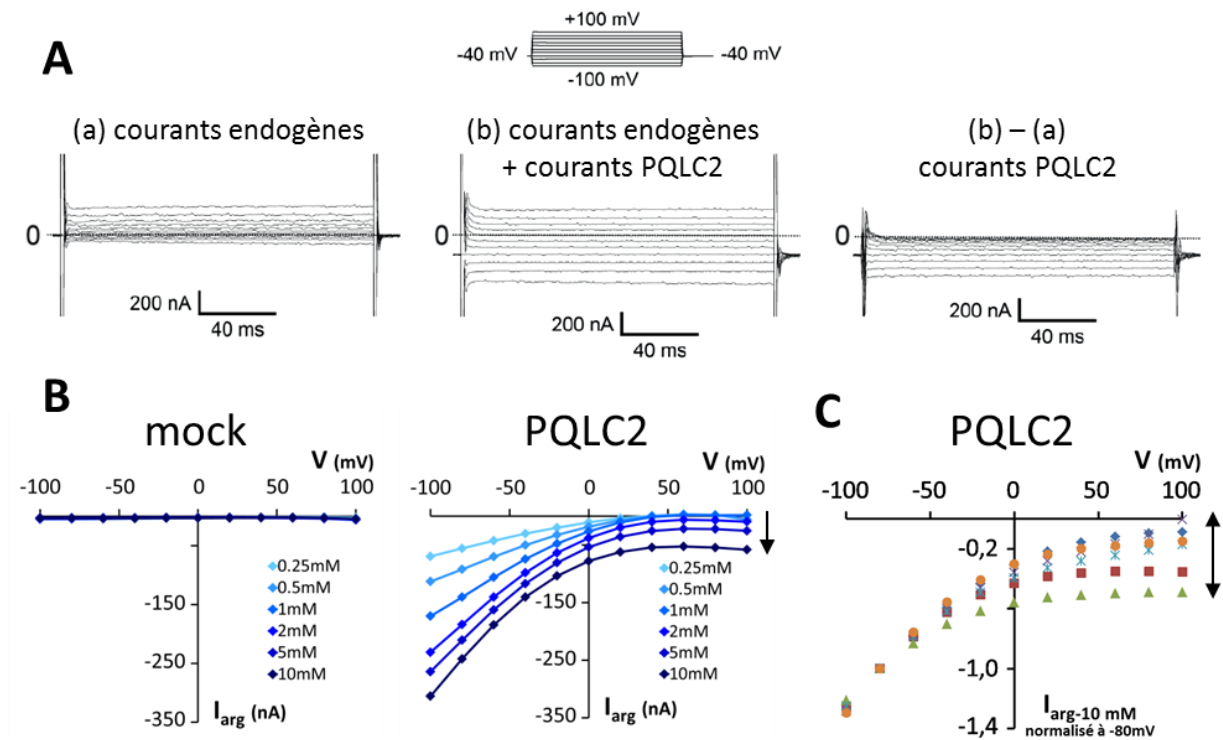


Figure 27 : Méthode de détermination des courants de transport de PQLC2 évoqués par l'arginine, et mise en évidence du « courant paradoxal ».

A) Méthode de détermination des courants évoqués (b-a). **B)** Relation courant-potential (I-V) pour une gamme de concentrations d'arginine perfusée sur des ovocytes mocks (gauche) ou exprimant PQLC2 (droite). **C)** Courbes I-V des courants de transport d'Arg 10 mM de 6 ovocytes PQLC2 provenant de 5 lots différents. Un courant paradoxal (flèches noires en B et C) apparaît aux potentiels positifs.

La dépendance au potentiel de PQLC2 est forte. Comme le suggère mes premiers résultats sur le couplage ionique de PQLC2, si PQLC2 est un uniporteur, la charge électrique de ce courant est uniquement portée par l'arginine transportée par PQLC2. Comme l'arginine est chargée positivement, le courant entrant de charges positives génère, par convention, un courant négatif. L'existence d'un fort courant aux potentiels positifs est inattendue car, si PQLC2 est un uniporteur, le flux net d'arginine dépend uniquement du gradient de CAA et du potentiel de membrane. Un potentiel de +100 mV devrait donc être capable de stopper ou réduire très fortement le flux entrant d'arginine. Par exemple, si la concentration cumulée de CAA endogènes est de 1 mM dans l'ovocyte (Taylor *et al.*, 1996) (Bravo and Allende, 1976), le transport médié par PQLC2 en présence de 10mM d'arginine externe doit s'équilibrer, donc s'annuler, vers +60 mV d'après la loi de Nernst. Ce courant entrant qui semble défier le mécanisme d'uniport déduit de nos mesures de flux sera appelé « courant paradoxal » par la suite.

Le transport endogène de l'arginine par l'ovocyte dans ces différentes conditions est inexistant ou électriquement neutre. Le courant de transport de l'arginine est donc spécifique de PQLC2. L'amplitude du courant paradoxal apparaît aux potentiels positifs et croît plus la concentration

d'arginine est élevée (**figure 27.B**). Elle est également variable pour une même condition (**figure 27.C**).

Ce courant paradoxal peut avoir de multiples origines comme par exemple un courant de fuite à travers PQLC2 lors des étapes de transconformation de la protéine liée à l'arginine (Chaudhry *et al.*, 2002). Il est d'ailleurs possible que ce courant soit également présent aux potentiels négatifs, mais mélangé avec le courant de transport de l'arginine. Nous avons donc défini un protocole permettant d'élucider la provenance de ce courant.

2.2. Le courant paradoxal dépend de l'« histoire » de l'ovocyte

Dans nos protocoles initiaux, nous utilisons souvent une application préliminaire de substrat pour évaluer la qualité de l'ovocyte PQLC2 avant de démarrer l'expérience. Une propriété importante du courant paradoxal a été révélée quand nous avons décidé d'utiliser des ovocytes sans exposition préalable aux CAA (ovocytes « naïfs ») et lorsque nous avons enregistré leur réponse à des applications successives de substrat. Le protocole dédié à ce problème consiste à perfuser successivement trois applications d'arginine à concentration saturante (20 mM) et d'appliquer, comme précédemment, le protocole de saut de potentiel avant et pendant chaque application.

Je vais tout d'abord décrire les résultats obtenus suite à la première application d'arginine sur un ovocyte naïf et au retour dans le milieu de référence après lavage de l'arginine (**figure 28**).

Les traces brutes (raw traces) correspondent aux courants réels enregistrés lors de l'application du protocole de sauts de potentiel dans les conditions pré-application (**figure 28**, #1, ovocyte « naïf »), pendant l'application d'arginine 20 mM (#2) et après cette application (#3, après lavage de l'arginine). Les courants évoqués (evoked traces) correspondent aux courants des traces brutes des différentes conditions auxquelles les courants endogènes (#1) ont été soustraits (# - 1). Le protocole est démarré une fois la stabilité électrique de l'ovocyte obtenue. A ce stade de l'expérience, si aucun changement de solution n'est effectué et si l'ovocyte est stable, la soustraction des courants enregistrés à différents temps (1 - 0) est nulle.

En présence d'arginine 20 mM dans le milieu (#2), un courant négatif fortement dépendant du potentiel et spécifique de PQLC2 est enregistré. Dans ces conditions d'ovocyte naïf, à potentiel très positif, le courant de transport est totalement stoppé par la dépolarisation de l'ovocyte à un potentiel $\geq +80$ mV. Cette fois-ci, ce comportement est en accord avec le mode de transport de type uniport. Le courant paradoxal n'est donc pas présent aux potentiels positifs.

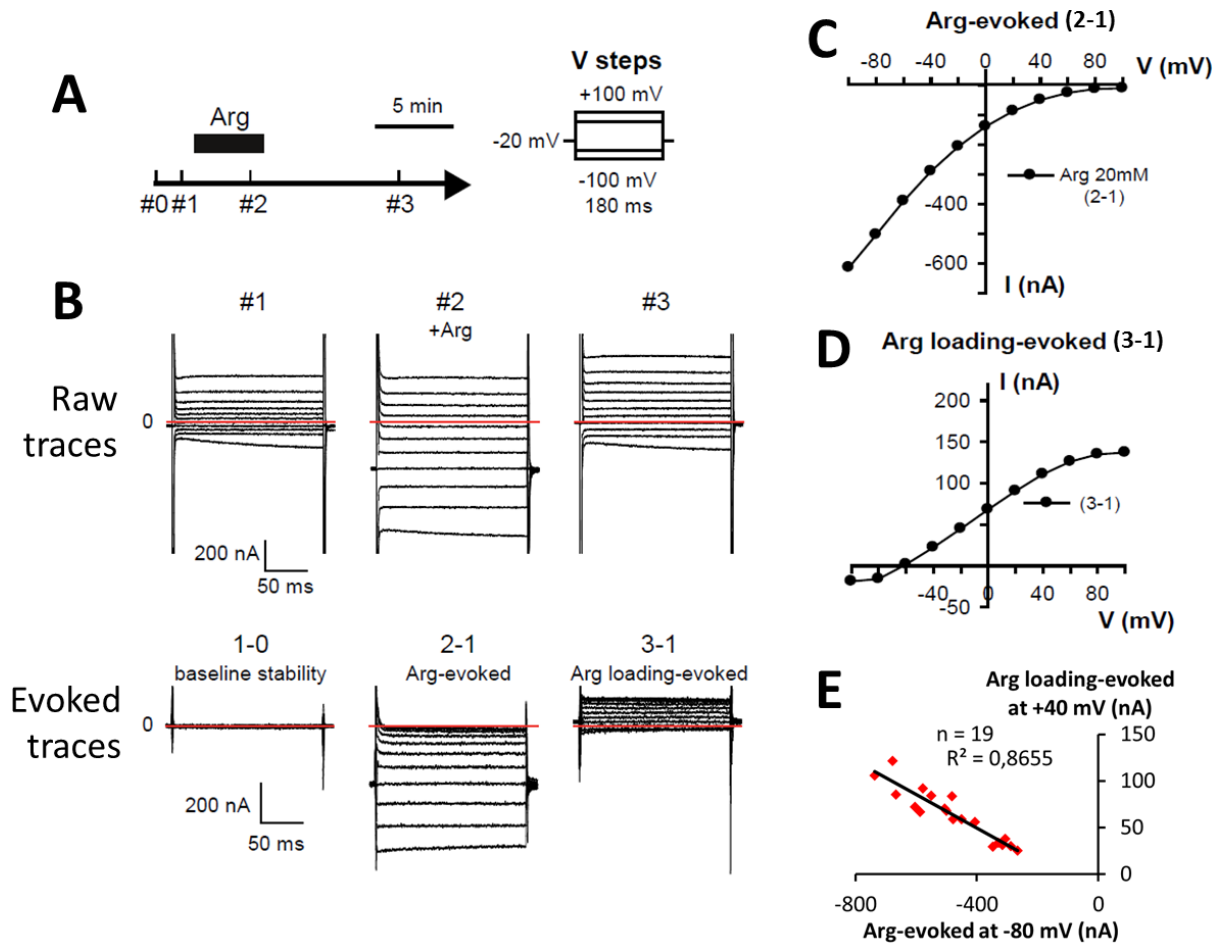


Figure 28 : La dépendance au potentiel du transport d'arginine par PQLC2 sur un ovocyte naïf est dépourvue du courant paradoxal et ce transport induit l'apparition d'un courant sortant lorsque l'arginine externe est lavée.

A) Protocole de perfusion et de sauts de potentiel. Les chiffres indiqués par le sigle « # » sur la frise chronologique représente les instants où sont réalisés les sauts de potentiel montrés en B. **B)** Haut : Traces brutes (raw traces) de courants enregistrés lors de la réalisation des sauts de potentiels avant (gauche), pendant (milieu) et après (droite) la perfusion d'arginine 20 mM. Bas : Traces de courants évoqués (evoked traces) par l'arginine obtenues par soustraction des courants endogènes. **C)** Courbe I-V des courants de transport d'arginine par PQLC2. **D)** Courbe I-V des courants sortants démasqués suite au lavage de l'arginine externe. **E)** Relation entre l'amplitude du courant entrant du transport d'arginine et l'amplitude du courant sortant suite au lavage de l'arginine externe. Chaque point représente un ovocyte.

Lorsque l'arginine est lavée (#3), les courants enregistrés diffèrent des courants endogènes de l'ovocyte (3 - 1). En effet, des courants positifs d'amplitude croissante avec le potentiel s'additionnent aux courants endogènes. Ce courant sortant, détecté après lavage de l'Arg, pourrait correspondre à l'efflux actif de l'Arg accumulée pendant l'application. Cela suggère que nos conditions expérimentales saturent la capacité de l'ovocyte à métaboliser l'Arg exogène (« vidange métabolique »). Deux données additionnelles corroborent cette interprétation :

1) Le courant d'efflux dans le milieu après lavage de l'arginine (3 - 1) est proportionnel au courant d'influx pendant l'application d'arginine (2 - 1) (**figure 28.E**). L'amplitude du courant sortant observé après lavage est ainsi directement lié au niveau d'expression de PQLC2, et donc à la quantité d'arginine qui entre lors de cette première application. Cette donnée est en accord (mais ne démontre pas) avec l'hypothèse d'un efflux médié par PQLC2.

2) Entre les sauts de potentiel, en présence d'arginine, le potentiel de membrane est imposé à -20 mV. Si on considère que la quantité d'arginine transportée dans l'ovocyte pendant la première application n'est pas métabolisée par l'ovocyte, un simple calcul prenant en compte l'amplitude du courant arginine mesuré à ce potentiel (I_{arg} (Arg-evoked); 200 nA), le temps d'application du substrat (T_s ; 300 s), la constante de Faraday (F ; 96 485 C/mol) le rapport charge-substrat de PQLC2 (R_{cs} ; +1), et le volume de l'ovocyte (V_o ; 0.5 μ L) permet d'estimer la concentration associée au remplissage en arginine de l'ovocyte [R_o] lors de l'application d'arginine :

$$[R_o] = (I_{arg} \cdot T_s / F) / (R_{cs} \cdot V_o) = 1 \text{ mM}$$

Cette concentration d'arginine (1 mM) génère un courant entrant d'une centaine de nanoampères lorsqu'elle est appliquée dans le bain de l'ovocyte à potentiel négatif (**figure 28.B**), soit un courant comparable au courant sortant que nous observons dans la condition #3.

L'historique de l'ovocyte est donc un élément important dans l'apparition du courant paradoxal. Un ovocyte naïf ne présente pas ce courant lors d'une première application d'arginine. Cette première application n'est pas neutre puisqu'elle est à l'origine d'un courant sortant observé lors du lavage de l'arginine du milieu. Cet efflux peut correspondre à de l'arginine accumulée dans l'ovocyte, lors du transport d'arginine externe par PQLC2, qui est exporté en retour hors de l'ovocyte par PQLC2 lorsque l'arginine externe est lavée.

2.3. Le courant paradoxal est un artefact de soustraction dû à la suppression du courant d'efflux par l'arginine externe

Après lavage de l'arginine de la première application, on poursuit le même protocole en appliquant une deuxième application d'arginine à 20 mM. L'application est finalement répétée une troisième fois (**figure 29**).

Les courants de transport bruts (#4) de l'arginine par PQLC2 lors de cette seconde application sont identiques à ceux enregistrés lors de la première application (#2). PQLC2 est à nouveau fortement influencé par le potentiel et son activité est entièrement bloquée par les potentiels très positifs. Le lavage de cette seconde application d'arginine (#5) fait réapparaître les courants sortants enregistrés préalablement suite au lavage de la première application d'arginine (#3). Leurs amplitudes sont même légèrement augmentées.

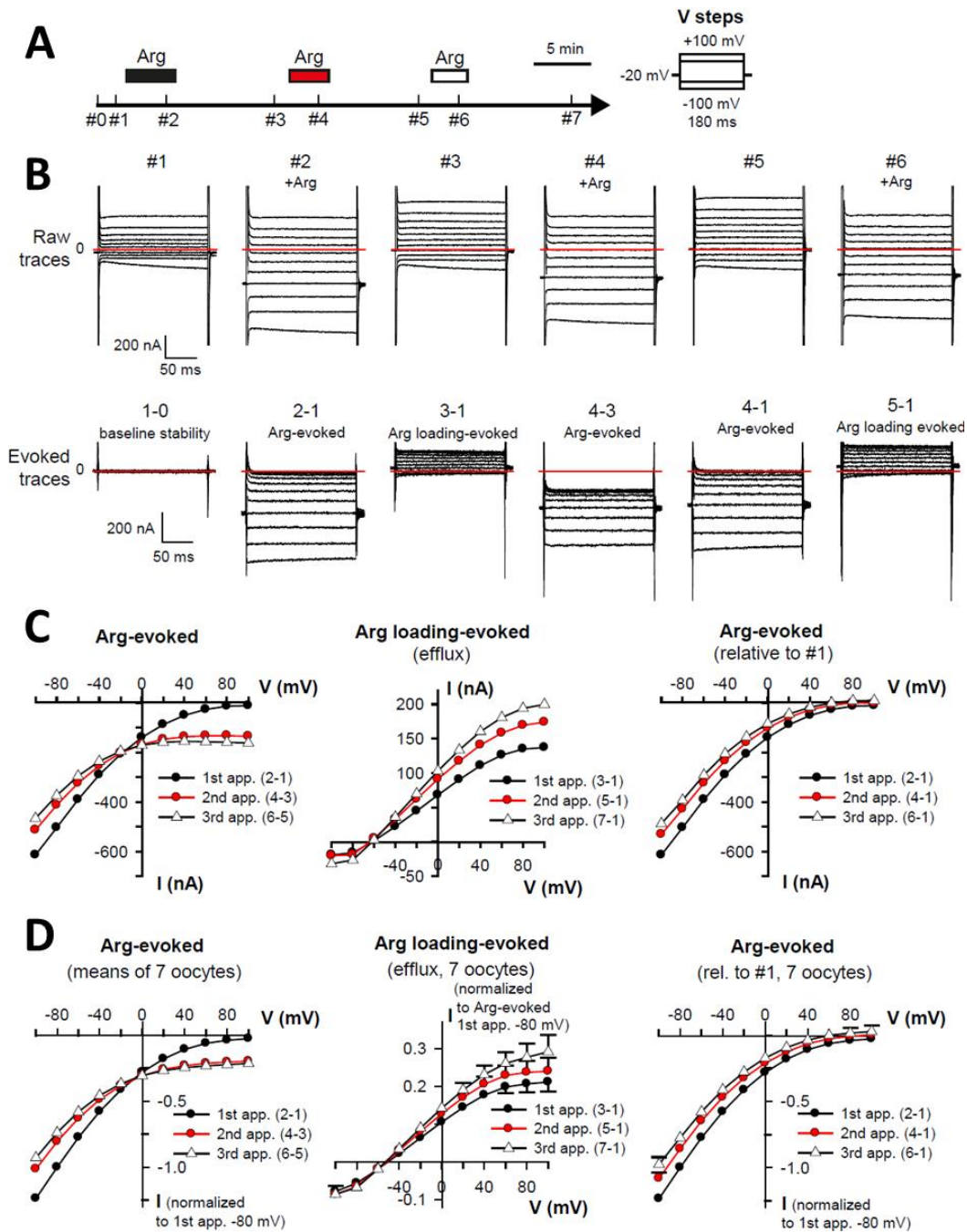


Figure 29 : Résultats du protocole de trois applications successives d'arginine sur un ovocyte naïf exprimant PQLC2.

A) Schéma du protocole d'application d'arginine 20 mM. **B)** Traces brutes (haut) et traces évoquées (bas) des courants enregistrés pour chaque protocole de sauts de potentiel appliqués durant le déroulement de l'expérience. **C)** Courbes I-V représentatives obtenues sur un ovocyte. Gauche et droite : Courbes I-V des courants évoqués lors des trois applications d'arginine. Les courbes I-V de gauche utilisent comme références les sauts de potentiel enregistrés dans le milieu précédant l'application d'arginine. Les courbes I-V de droite utilisent comme référence unique les sauts de potentiels enregistrés en tout début d'expérience sur un ovocyte naïf. Les courbes I-V du milieu représentent le courant sortant apparaissant suite au lavage de chaque application d'arginine. La référence unique utilisée pour ces courants correspond aux sauts de potentiel enregistrés en tout début d'expérience sur un ovocyte naïf. **D)** Courbes I-V moyennées obtenues sur un ensemble de 7 ovocytes.

Par contre, une différence importante apparaît lorsque les courants mesurés dans le milieu avant la seconde application d'arginine (#3) sont soustraits des courants enregistrés pendant l'application (#4) afin d'isoler les courants portés par PQLC2 (4 - 3). Cette fois ci, le courant paradoxal apparaît aux potentiels positifs (**figure 29.C et 29.D**). En utilisant cette même procédure, on observe que le courant paradoxal perdure lors de la troisième application d'arginine, alors même que les traces brutes de courants enregistrées pendant cette troisième application sont identiques à celles de la première application. Ainsi, les courants bruts enregistrés durant ces 3 applications sont identiques (comparer les traces bruts #2, #4 et #6). Le seul phénomène qui permet de différencier les courants de transport de PQLC2 évoqués par l'arginine lors de la première application des deux suivantes est donc l'apparition du courant sortant suite à la première application d'arginine.

L'emploi de la procédure classiquement utilisée pour extraire les courants de transport évoqués par le substrat ne semble donc pas être applicable à la lettre dans notre situation. La première application est à l'origine du remplissage de l'ovocyte en arginine qui est alors exportée de manière électrogénique lors du retour dans le milieu de référence. Les courants enregistrés par la suite dans le milieu de référence seront donc la somme des courants endogènes de l'ovocyte et de ce courant d'efflux probablement médié par PQLC2. Ils ne peuvent donc pas être utilisés comme référence pour estimer le courant évoqué de transport de l'arginine lors de la deuxième et troisième application d'arginine. Leur utilisation en tant que tel est ainsi liée, au moins en partie, à l'origine du courant paradoxal.

En utilisant les ovocytes naïfs (#1) comme référence à soustraire, on isole donc le courant *réellement porté par PQLC2* en présence d'arginine. Un point étonnant à ce stade est la disparition du courant d'efflux en présence de 20 mM d'arginine externe, malgré la présence d'une concentration substantielle d'arginine interne lors de cette seconde application ou de l'application suivante. Cet efflux devrait se matérialiser par des courants positifs aux potentiels positifs. Nous reviendrons amplement sur ce phénomène par la suite.

3. Le courant d'efflux d'acides aminés cationiques internes est rendu silencieux par l'arginine externe, mais pas par la lysine

Afin de comparer la dépendance au potentiel du transport des substrats de PQLC2, nous avons entrepris d'étudier celles de l'histidine et de la lysine. L'étude de l'histidine n'a pas pu aboutir car son transport dans l'ovocyte affecte les conductances endogènes. Cet effet est probablement dû à l'acidification du cytoplasme lors de la déprotonation de l'histidine suite à son transport dans l'ovocyte. Son étude a été rendue possible ultérieurement par l'approche du patch-clamp sur cellules HEK qui est présentée dans une autre section.

3.1. Etude de la dépendance au potentiel du transport de lysine

Pour répondre à cette question, le protocole de sauts de potentiel a été réalisé avec 2 applications successives de lysine, suivies d'une application d'arginine à concentrations saturantes (20mM) (**figure 30.A**).

Comme pour l'arginine, l'application de lysine 20 mM sur des ovocytes injectés par de l'eau au lieu de l'ARNc de PQLC2-LL/AA-EGFP n'évoque aucun courant (données non présentées). Le courant de transport de lysine mesuré sur des œufs PQLC2 est donc spécifique de PQLC2.

L'application de lysine sur des œufs PQLC2 génère de forts courants entrants à potentiel négatif, similaire à ceux observés pour l'arginine (**figure 30.B**, #2). Cependant, un courant sortant apparaît aux potentiels positifs. Ce comportement est attendu dans le cas d'un uniporteur électrogénique, dont le flux net de transport ne dépend que du gradient électrochimique, et, par conséquent, si la lysine s'accumule à l'intérieur de l'ovocyte. Or, en effet, comme pour les expériences de perfusion d'arginine, la « vidange métabolique » de la lysine exogène de l'ovocyte semble rapidement saturée (*cf* ci-dessous). Selon l'estimation obtenue en intégrant le courant entrant au potentiel de maintien (-20 mV), la quantité de Lys accumulée dans l'ovocyte atteindrait une concentration proche du millimolaire (2.5 mM pour cette expérience).

Lorsque la lysine est lavée (#3), les courants de transport observés aux potentiels négatifs retrouvent des valeurs proches de celles des courants endogènes. En revanche aux potentiels positifs, le courant

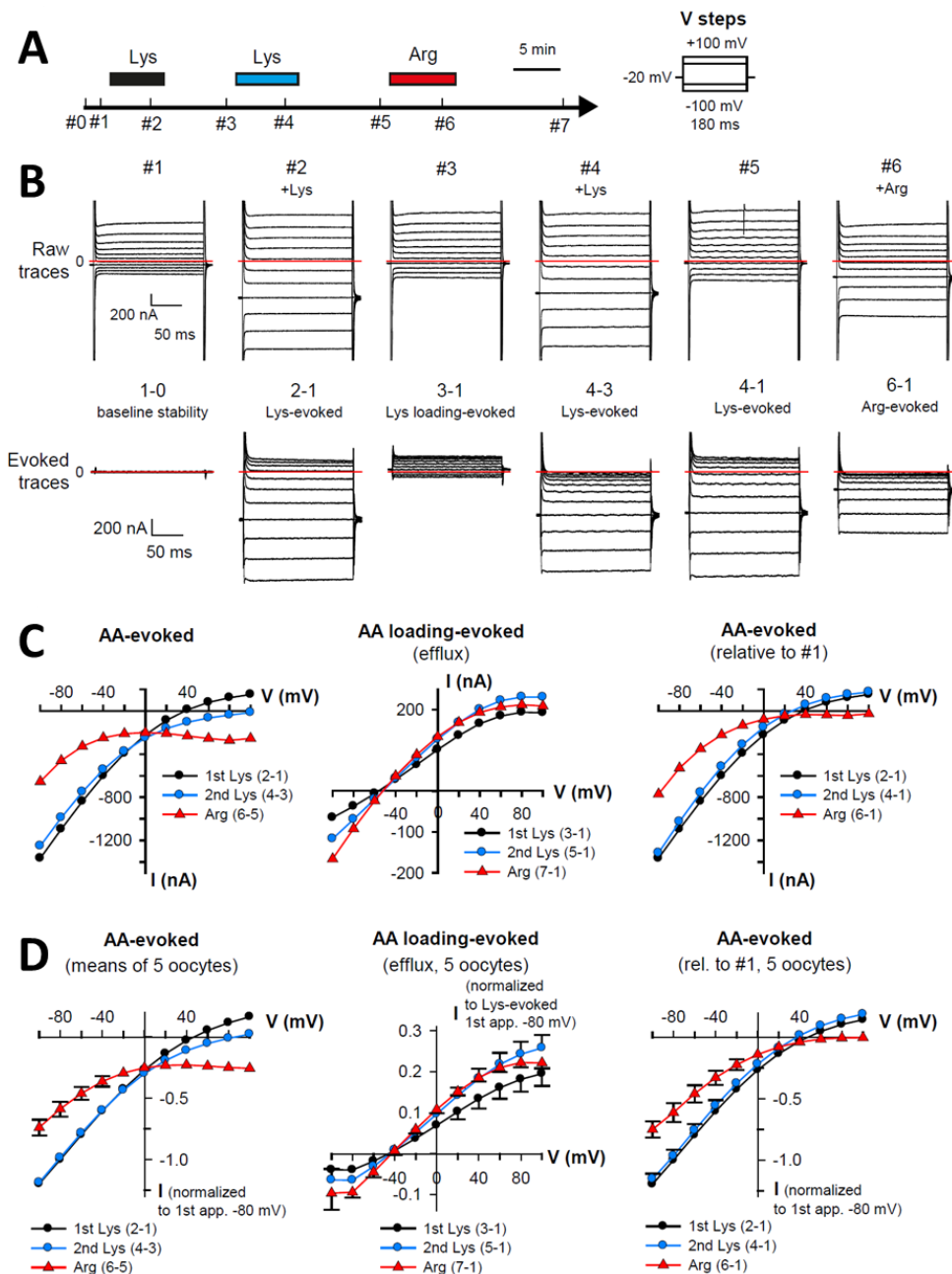


Figure 30 : Résultats du protocole d'application de la Lysine sur un ovocyte naïf exprimant PQLC2.

A) Schéma du protocole d'application des CAA. Deux applications successives de Lysine à 20 mM sont réalisées sur un ovocyte naïf suivi d'une application d'arginine à 20 mM. **B)** Traces brutes (haut) et traces évoquées (bas) des courants enregistrés pour chaque protocole de sauts de potentiel appliqués durant le déroulement de l'expérience. **C)** Courbes I-V représentatives obtenues sur un ovocyte. Gauche et droite : Courbes I-V des courants évoqués lors des trois applications de CAA. Les courbes I-V de gauche utilisent comme références les sauts de potentiel enregistrés dans le milieu précédent l'application d'un CAA. Les courbes I-V de droite utilisent comme référence unique les sauts de potentiels enregistrés en tout début d'expérience sur un ovocyte naïf. Les courbes I-V du milieu représentent le courant sortant apparaissant suite au lavage de chaque CAA. La référence unique utilisée pour ces courants correspond aux sauts de potentiel enregistrés en tout début d'expérience sur un ovocyte naïf. **D)** Courbes I-V moyennées obtenues sur un ensemble de 5 ovocytes.

sortant perdure. Comme le potentiel imposé entre les sauts de potentiel est de -20 mV, l'efflux de lysine à travers PQLC2 est faible, il n'est donc pas étonnant de voir ce courant perdurer car la concentration interne en lysine doit très peu changer. Lors des sauts de potentiel, le courant sortant de lysine enregistré aux potentiels positifs sera donc très peu modifié.

La deuxième application de lysine donne des courants identiques aux courants enregistrés lors de la première application, c'est-à-dire sans perte des courants sortants (#4).

L'amplitude du courant sortant déterminée suite au lavage de la deuxième application de lysine (#5) est, comme avec l'arginine, à nouveau légèrement plus élevée que celle enregistrée lors du lavage de la première application (#3). C'est ce qui est attendu si on considère que l'accumulation de Lys de la deuxième application a augmenté la concentration interne de l'ovocyte en Lys.

Par contre, à la fin de l'expérience, l'application d'arginine 20 mM dans le milieu (#6) supprime le courant d'efflux de lysine. L'arginine externe semble donc bloquer le courant d'efflux quelle que soit la nature du CAA impliqué.

Deux types d'hypothèses peuvent être invoquées pour expliquer la suppression du courant d'efflux par l'arginine 20 mM externe :

- 1) l'arginine inhibe PQLC2. Par exemple, en exerçant un contrôle allostérique qui fonctionnerait seulement à potentiel positif ;
- 2) l'arginine supprime le courant sortant, mais pas l'efflux de CAA interne qui se poursuivrait sous une forme d'échange CAA_{int}/Arg_{ext} électroneutre, donc indétectable en TEVC. Je reviendrai plus loin sur cette seconde hypothèse.

Afin de ne pas trancher trop tôt entre ces deux scénarios, je décrirai par la suite l'effet de l'arginine externe en disant qu'elle rend l'efflux de CAA « silencieux », quel que soit le mécanisme mis en jeu (inhibition de PQLC2 ou « neutralisation » sans blocage de l'efflux).

Notons qu'en présence d'arginine dans le milieu externe (#6), l'amplitude des courants entrants observés aux potentiels négatifs (6 - 1) est presque deux fois plus faible que celles observées en présence de lysine (4 - 1 et 2 - 1). Je reviendrai plus en détail sur ce dernier aspect dans une expérience qui lui sera dédiée (cf Section 7).

3.2. La mise sous silence de l'efflux dépend exclusivement de l'arginine externe

En plus des séquences d'application en substrat Arg-Arg-Arg (RRR, **figure 29**) et Lys-lys-Arg (KKR, **figure 30**), nous avons testés les séquences KRK et RKR (**figure 31**) afin de s'assurer que l'effet de mise sous silence de l'efflux des CAA par l'Arg externe n'est pas dépendant de la séquence d'application de ces CAA.

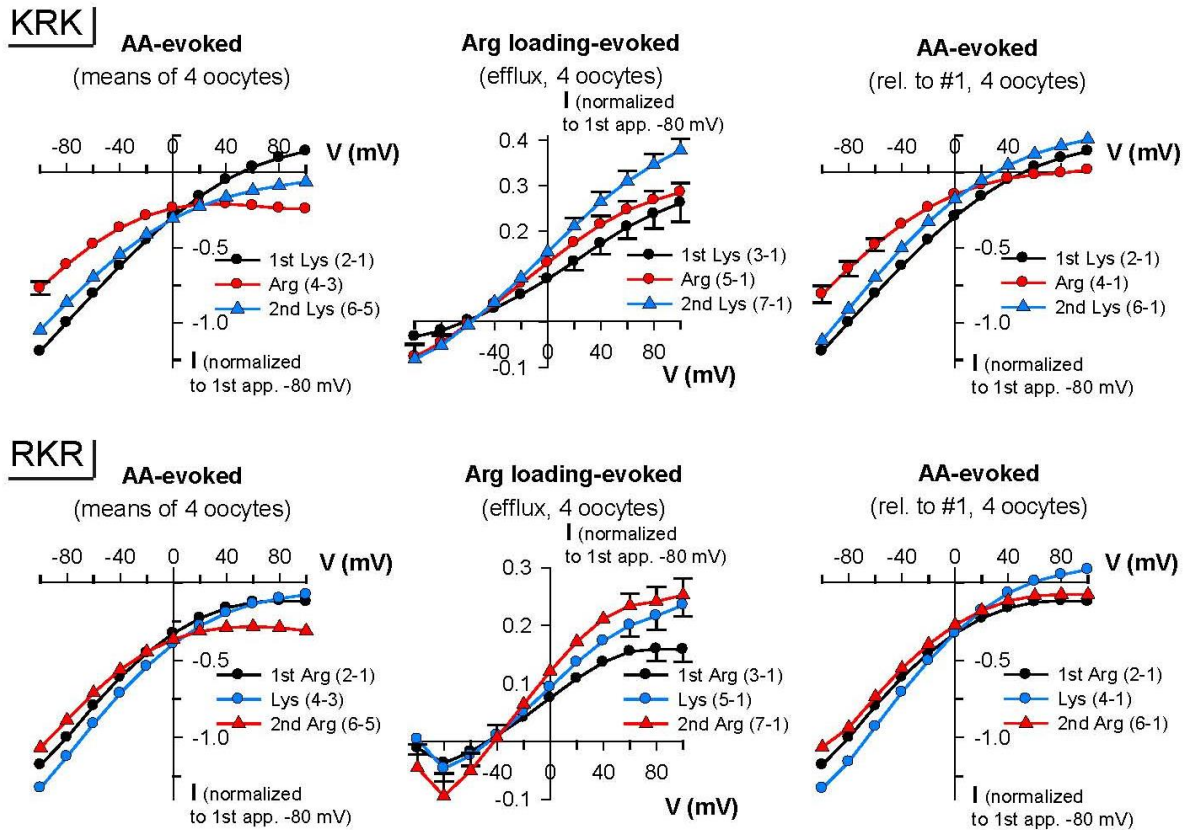


Figure 31 : Evaluation de l'importance de l'ordre des applications des substrats sur l'effet de mise sous silence de l'efflux lors du protocole de trois applications successives de CAA sur un ovocyte naïf.

En haut : la séquence d'application des substrats est Lys-Arg-Lys. En Bas : la séquence d'application des substrats est Arg-Lys-Arg. A gauche : Courbes I-V moyennées utilisant comme références les sauts de potentiel enregistrés dans le milieu précédent l'application des CAA. A droite : Courbes I-V moyennées utilisant comme référence unique les sauts de potentiels enregistrés en tout début d'expérience sur un ovocyte naïf. Les courbes I-V du milieu représentent le courant sortant apparaissant suite au lavage de chaque application de CAA. La référence unique utilisée pour ces courants correspond aux sauts de potentiel enregistrés en tout début d'expérience sur un ovocyte naïf.

Les courbes I-V de gauche de la **figure 31**, utilisant le système de référence « classique », ne seront pas détaillées dans cette expérience. Mais elles sont montrées afin d'être comparées par la suite aux résultats obtenus sur le système de patch clamp.

Le comportement des courbes I-V pour l'arginine et pour la lysine ont les mêmes caractéristiques qu'observées précédemment indépendamment de la séquence de perfusion en Arg ou Lys. L'application d'Arg ou de Lys est toujours associée à la genèse d'un efflux aux potentiels positifs suite à leur lavage. L'amplitude de cet efflux augmente avec le nombre d'applications de substrat indépendamment de la nature du celui-ci (on notera quand même que l'efflux suite à la perfusion d'arginine, comparé à la lysine, semble de plus faible amplitude). Les courants de transport évoqués

par la lysine comprennent toujours une composante sortante aux potentiels positifs. Ceux de l'arginine sont toujours nuls voir légèrement entrant à ces potentiels et ce malgré la présence d'un efflux de CAA avant sa perfusion. L'effet de mise sous silence de l'efflux dépend donc exclusivement de l'arginine externe.

Notons que, dans le cas de la séquence RKR, la présence d'un léger courant paradoxal lors de la première application d'arginine (courbe noire). Comme je vais le présenter dans la section suivante, cela est probablement lié au fait que le niveau des CAA endogènes n'est pas négligeable dans certaines préparations d'ovocytes. Par conséquent, la ligne de base d'un ovocyte naïf peut déjà contenir un petit efflux de CAA endogène, qui est mis sous silence lors de la première application d'Arg et qui génère donc un petit courant paradoxal.

Le courant de transport évoqué par la lysine présente toujours un efflux en première application. Dans notre système de TEVC, il est donc difficile voire impossible d'étudier précisément la dépendance au potentiel de l'arginine ou de la lysine dans des conditions zéro-trans (pas de substrats pour PQLC2 dans le cytoplasme). Nous avons donc entrepris d'analyser ces paramètres dans un autre système d'expression qui permet le contrôle du compartiment intracellulaire. La méthode de patch clamp en configuration cellule entière a été retenue car elle répond à cette exigence. Cette approche a été appliquée à des cellules HEK293T car elles permettent un bon niveau d'expression du transporteur. L'utilisation de cette approche permettra également de tester si la différence du comportement de transport de l'arginine et de la lysine est un phénomène intrinsèque à PQLC2 ou un artefact lié à l'ovocyte.

4. Mise en évidence d'un courant paradoxal induit par les acides aminés cationiques endogènes

Pour plusieurs préparations d'ovocytes (c'est le cas en particulier de ceux utilisés dans la séquence d'application RKR de l'étude précédente, **figure 31**), on observe l'apparition du courant paradoxal en perfusant de l'Arg saturante alors même qu'aucun CAA n'a été préalablement perfusé dans le bain (œufs naïfs). Cette amplitude est variable au sein d'un même lot d'ovocyte. Elle l'est également d'un lot d'ovocytes à l'autre (**figure 32.A**).

Plusieurs études qui se sont intéressées au contenu en acides aminés des ovocytes de Xénopes obtiennent des valeurs de concentration en CAA de l'ordre du millimolaire (Bravo and Allende, 1976) (Taylor *et al.*, 1996). Comme le fond génétique des Xénopes est variable (à la différence par exemple des lignées consanguines de souris), il paraît normal d'observer des variations de concentration interne en CAA entre différents animaux.

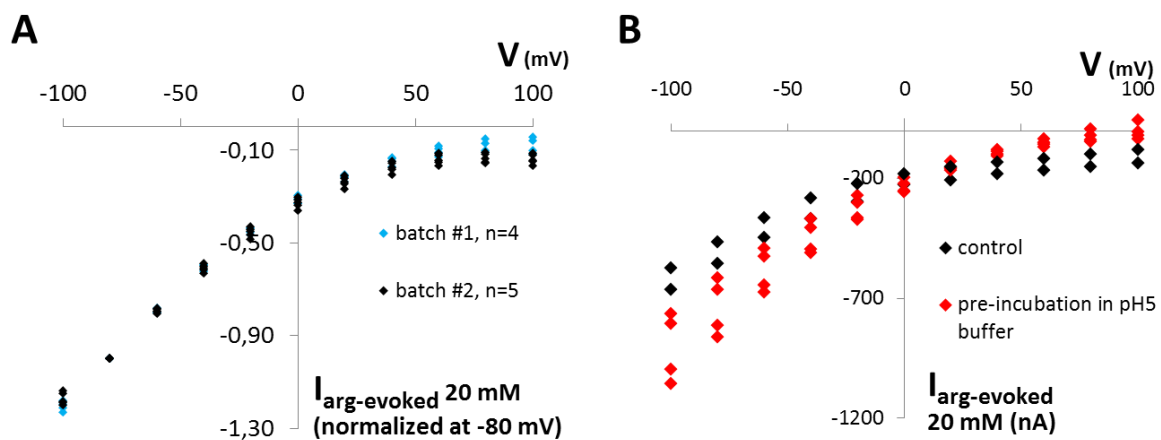


Figure 32 : analyse de l'effet des acides aminés cationiques endogènes sur l'amplitude du courant paradoxal.

A) Courbes I-V du courant de transport d'arginine 20 mM d'ovocytes PQLC2 naïfs provenant de deux Xénopes différents. **B)** Courbes I-V du courant de transport d'arginine 20 mM de deux groupes d'ovocytes PQLC2 naïfs du même lot. Avant d'appliquer l'arginine externe, un groupe d'ovocytes a été pré-incubé dans un milieu à pH 5.0 pendant 45 minutes (rouge) afin de favoriser l'efflux des CAA endogènes. Un groupe sert de témoin (noir).

Comme PQLC2 est réversible et activé à pH acide, nous avons testé l'hypothèse qu'une pré-incubation d'un ovocyte PQLC2 naïf dans un milieu salin à pH5.00 vidange son contenu en CAA et ainsi réduise l'amplitude du courant paradoxal observée avec l'arginine en TEVC (**figure 32.B**). La préincubation d'ovocytes dans un milieu à pH5.0 au minimum une demi-heure avant leur utilisation permet effectivement de diminuer l'apparition et l'amplitude des courants paradoxaux. Cette procédure permet ainsi de diminuer la variabilité des résultats sur une même expérience.

Cette procédure a donc été utilisée systématiquement dans le reste des expériences réalisées en TEVC sur ovocytes de Xénope.

5. Etude de la dépendance au potentiel de PQLC2 par la méthode de patch clamp sur cellules HEK293T

5.1. Les dépendances au potentiel du transport de lysine et d'arginine sont identiques en condition zéro-trans

Le protocole de patch clamp est détaillé dans la section « Méthodes ».

La première condition testée correspond à une situation où la pipette de patch ne contient ni lysine, ni arginine (condition zéro-trans ; **figure 33**). Le milieu qui baigne la cellule patchée est perfusé successivement par de l'arginine et de la lysine à 20mM. Le protocole de rampe de potentiels est appliqué à des cellules qui expriment PQLC2 à la membrane plasmique et à des cellules non transfectées (60-70% de taux de transfection) présentes dans la même boîte de culture (**figure 33.A**).

La procédure pour extraire les courants évoqués par l'application d'un CAA consiste à enregistrer les courants d'une rampe de potentiels réalisée dans le milieu de référence précédent l'application du CAA, puis à enregistrer les courants d'une rampe de potentiels réalisée en présence du CAA. Il suffit alors de soustraire les courants de pré-application (endogènes) aux courants obtenus pendant l'application du CAA pour obtenir les courants évoqués par celui-ci. A la différence de l'approche TEVC sur ovocyte, on impose ici le contenu intracellulaire de la cellule par la diffusion du contenu intra-pipette qui possède un volume considérablement plus grand que celui de la cellule. Il n'y a donc a priori pas d'effet d'accumulation du substrat transporté par PQLC2 dans la cellule.

Comme pour les ovocytes, le transport endogène de l'arginine et de la lysine des cellules HEK293T est électroneutre, ou très inférieur à celui porté par la protéine PQLC2 recombinante (comparer les traces de courant et les courbes I-V **figure 33**). Le courant observé sur des cellules PQLC2 perfusées avec de la lysine ou de l'arginine est donc exclusivement dû au transport médié par PQLC2. Ce courant atteint plusieurs centaines de picoampères aux potentiels négatifs pour les deux substrats. Il est donc facilement mesurable.

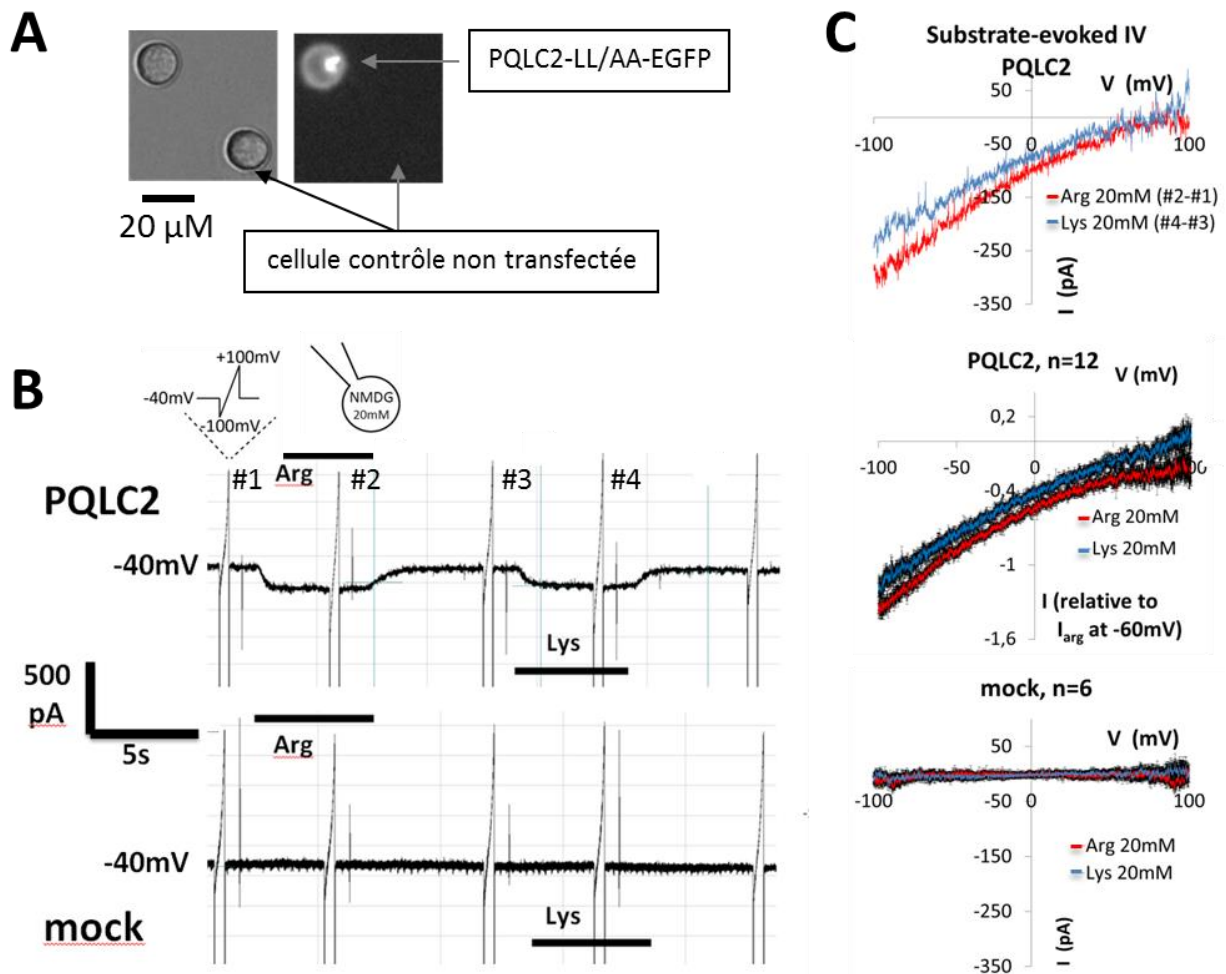


Figure 33 : Mesure de la dépendance au potentiel des courants de transport de l'arginine et de la lysine médié par PQLC2 dans des cellules HEK293T par la technique de patch clamp.

A) Image d'une cellule HEK293T exprimant PQLC2-LL/AA-EGFP (en haut à gauche) à la membrane plasmique, et d'une cellule servant de témoin négatif (en bas à droite). **B)** Courants enregistrés lors de la réalisation du protocole automatisé alliant la perfusion successive d'arginine 20 mM et de lysine 20 mM, et la réalisation de plusieurs rampes de potentiels. Le protocole est appliqué sur une cellule exprimant PQLC2 (haut) et sur une cellule servant de témoin négatif (bas). Le protocole est détaillé dans le chapitre « Méthodes ». **C)** Haut : Courbes I-V des courants évoqués par la perfusion d'arginine (rouge) et lysine (bleu) sur une cellule exprimant PQLC2. Ces courbes correspondent aux traces de courants présentés en B. Milieu : Courbe I-V des courants moyennés sur 12 cellules. Bas : Courbes I-V des courants d'arginine et de lysine évoqués moyens obtenus sur un groupe de 6 cellules n'exprimant pas PQLC2.

Ces mesures révèlent que les dépendances au potentiel des transports de lysine et d'arginine sont identiques, et que les amplitudes de courants sont proches. A la différence des courants obtenus sur ovocyte, le courant de transport de l'arginine est même légèrement supérieur à celui de la lysine.

De plus, le courant de lysine ne présente pas de courant d'efflux aux potentiels positifs. De même, à la différence des expériences sur ovocyte, une seconde application d'arginine ne contient pas de

courant paradoxal (résultats non présentés). Comme il n'y a pas de CAA dans la pipette, ces résultats confirment que le courant paradoxal est lié à la présence de CAA dans le compartiment intracellulaire.

Nous avons ensuite étudié l'effet d'un ajout de lysine ou d'arginine dans le milieu interne des cellules en utilisant des pipettes contenant 20mM de lysine ou d'arginine.

5.2. L'ajout d'acides aminés cationiques dans le compartiment cytosolique reproduit les résultats obtenus sur ovocytes de Xénopes

Les résultats de patch clamp sur cellules HEK en configuration cellule entière obtenus en utilisant des pipettes contenant 20 mM de lysine ou d'arginine et sur lesquelles sont perfusées de l'arginine ou de la lysine à 20 mM sont présentées dans la **figure 34**.

L'application de lysine ou d'arginine exogène ne génère aucun courant sur des cellules HEK non transfectées, quel que soit le contenu en lysine ou en arginine du milieu intracellulaire.

L'influx de lysine à travers PQLC2 n'est pas affecté par la présence de CAA interne. En revanche, comme pour les ovocytes, la présence de CAA dans la pipette induit, aux potentiels positifs, un courant entrant similaire au courant paradoxal lorsqu'on applique de l'arginine externe à 20 mM. Ce courant entrant apparaît quel que soit le CAA présent dans la pipette. Ces expériences réalisées sur un nouveau système d'expression confirment donc l'effet spécifique de mise sous silence par l'arginine externe de l'efflux de CAA internes médié par PQLC2.

Nous avons essayé d'étudier le courant d'efflux médié par PQLC2 dans ces conditions. Comme à ce jour aucun inhibiteur de PQLC2 n'est connu, il nous est impossible d'isoler la référence « zéro-int/zéro-ext » (correspondant à l'étape #1 de l'ovocyte) pour les cellules HEK. Une tentative faite pour isoler cette référence a été de comparer les courants de la cellule dans le tampon pH 5.0 (PQLC2 actif) à ceux enregistrés dans le tampon pH 7.4 (PQLC2 inactif). Cependant, l'effet du changement de pH affecte profondément les courants endogènes enregistrés sur ces cellules (**figure 35**). Cette astuce n'est donc pas applicable. Une autre possibilité a consisté à comparer l'amplitude des courants obtenus aux potentiels positifs dans le tampon pH 5.0 de cellules patchées en présence de lysine ou d'arginine interne, à celles obtenues sur des cellules patchées avec une pipette sans CAA (**figure 36**). Malgré la présence de courants positifs de plus grande amplitude aux potentiels positifs lorsque la pipette contient de la lysine, il est très difficile d'estimer les courants d'efflux car les courants enregistrés dans différentes cellules pour une même condition varient beaucoup. Cela vient probablement du fait que la taille et le niveau d'expression des cellules HEK293T sont très hétérogènes. Cette approche ne permet donc pas d'extraire proprement les courants d'efflux de lysine.

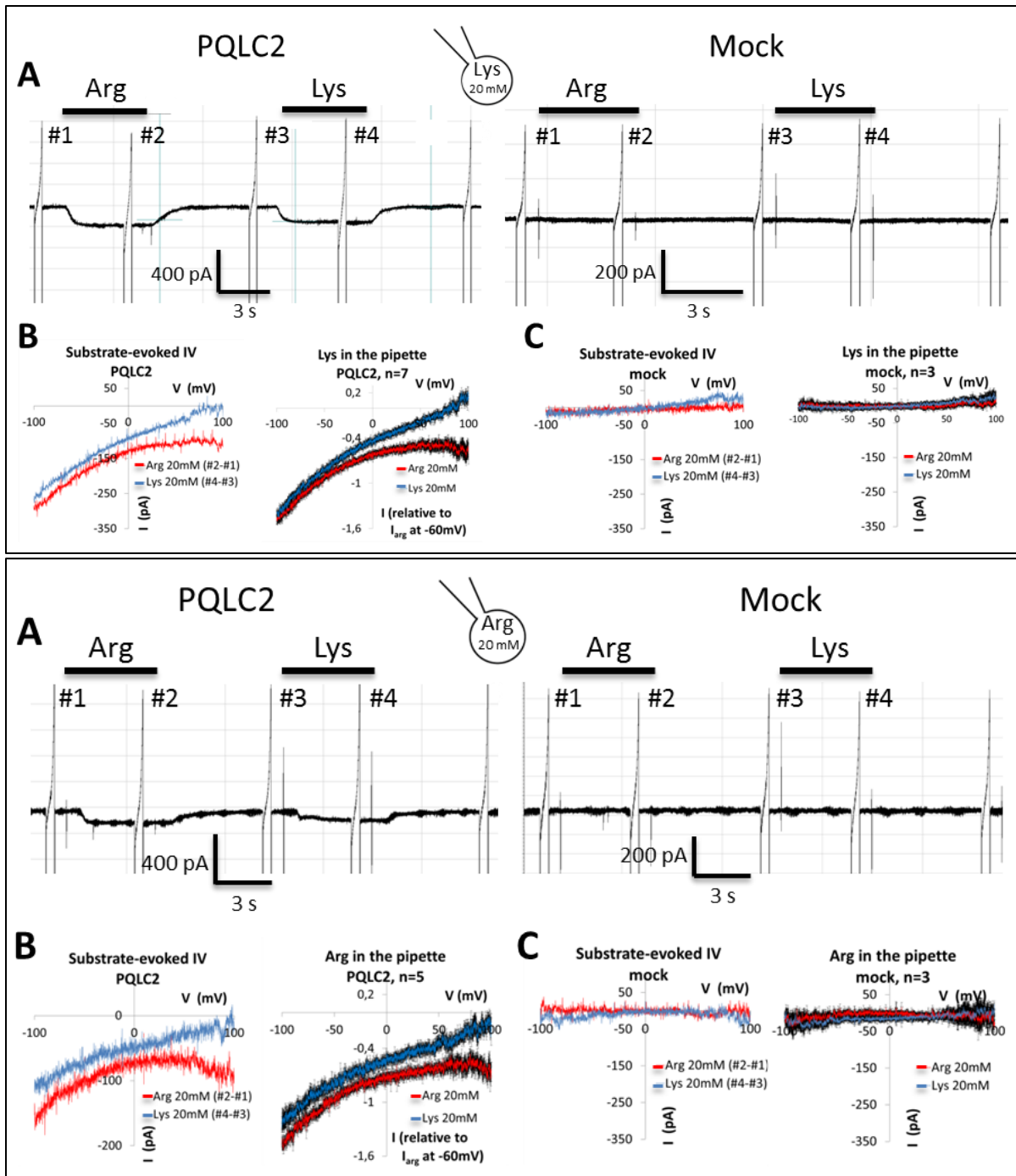


Figure 34 : Etude de l'effet de la lysine ou de l'arginine interne sur la dépendance au potentiel des courants de transport d'arginine et de lysine externes.

Expériences en présence de lysine 20 mM (panneau supérieur) ou d'arginine 20 mM (panneau inférieur) dans la pipette de patch. **A)** Courants de transport de lysine et d'arginine enregistrés sur une cellule exprimant PQLC2 (gauche) et une cellule non transfectée (droite). **B)** Gauche : Courbes I-V des courants évoqués par l'arginine 20 mM (rouge) et la lysine 20 mM (bleue) obtenues à partir des traces de courant présentées en A sur une cellule PQLC2. Droite : Courbes I-V des courants évoqués d'arginine et de lysine moyennés. **C)** Gauche : Courbes I-V des courants évoqués par l'arginine 20 mM (rouge) et lysine 20 mM (bleue) obtenues d'après les traces de courant présentées en A sur une cellule non transfectée. Droite : Courbes I-V des courants évoqués d'arginine et de lysine moyennés.

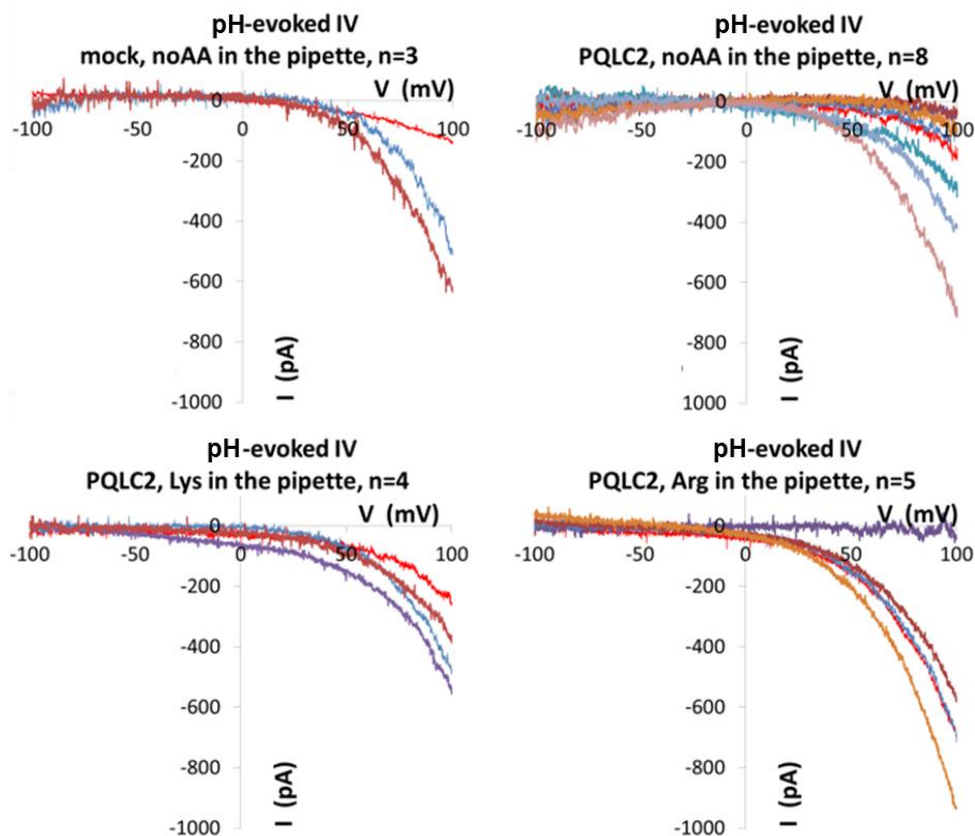


Figure 35 : Effet de l'alcalinisation du milieu externe sur les courants membranaires des cellules HEK exprimant ou non PQLC2.

Courbes I-V des courants membranaires évoqués par la perfusion d'un milieu à pH 7.4 à partir d'un milieu à pH 5.0. Chaque trace représente une cellule. Haut : pas de CAA dans la pipette de patch. Gauche : cellules non transfectées (témoins négatif) ; Droite : cellules PQLC2. Bas : cellules PQLC2 avec CAA dans la pipette. Gauche : Lys 20 mM dans la pipette ; Droite : Arg 20 mM dans la pipette.

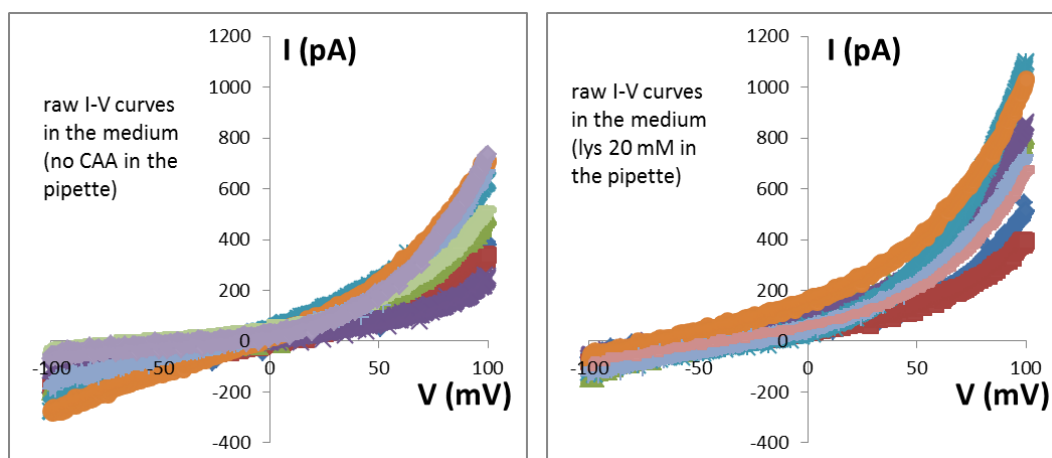


Figure 36 : Courbes I-V des courants enregistrés sur des cellules HEK PQLC2 en absence ou en présence de lysine 20 mM dans la pipette de patch.

Chaque trace représente une cellule.

5.3. La mise sous silence de l'efflux d'acides aminés cationiques internes est propre à l'arginine externe : étude de la dépendance au potentiel de l'histidine

Le transport d'histidine par PQLC2 dans les ovocytes de Xénopes génère une modification des courants endogènes de la membrane de l'ovocyte. Cet effet est probablement dû à une acidification du cytoplasme de l'ovocyte pendant l'application. Nous avons donc testé le transport de l'histidine par l'approche du patch clamp sur cellules HEK car la diffusion du tampon du milieu intrapipette devrait limiter ce phénomène.

Dans nos conditions, le transport endogène d'histidine par les cellules HEK est électroneutre ou négligeable (**figure 37**, panneau supérieur). Son transport par PQLC2 n'affecte pas les courants endogènes de la cellule, probablement en raison de la forte concentration du tampon interne. Cette configuration permet donc d'étudier la dépendance au potentiel du transport de l'histidine médié par PQLC2.

Lorsqu'aucun CAA n'est présent dans la pipette (**figure 37**, panneau supérieur), la dépendance au potentiel du courant de transport de l'histidine est proche de celle de l'arginine. L'amplitude des courants de transport d'histidine est même légèrement supérieure à ceux de l'arginine. Lorsqu'on ajoute 20 mM de lysine dans la pipette (**figure 37**, panneau inférieur), le courant paradoxal n'apparaît pas en présence d'histidine dans le milieu. Le transport d'histidine suit donc le même comportement que celui de la lysine aux potentiels positifs. L'effet de mise sous silence par le CAA en *trans* est donc spécifique à l'arginine.

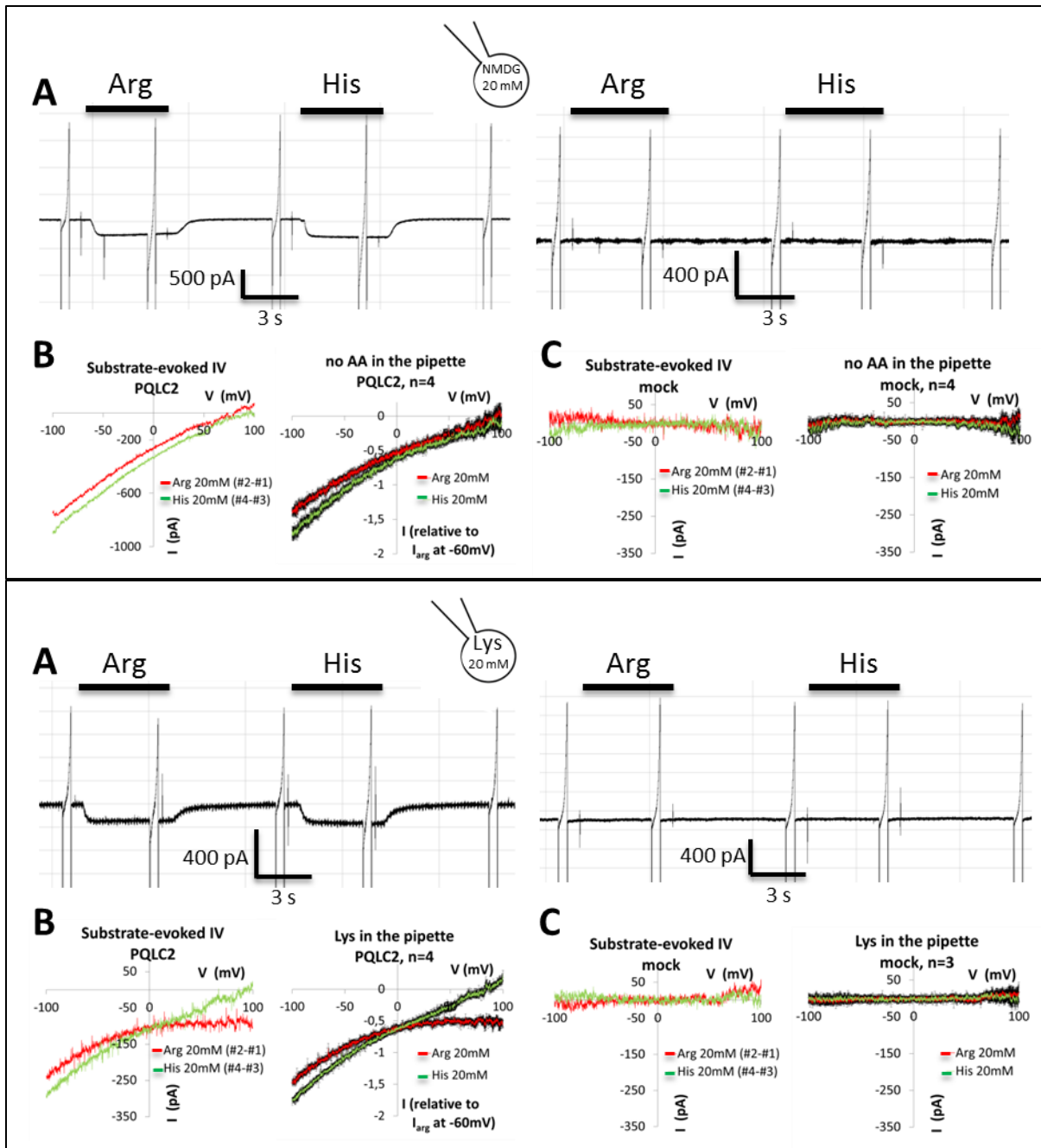


Figure 37 : Etude de la dépendance au potentiel du courant porté par l'histidine et de son interaction avec la lysine présente dans le compartiment intracellulaire.

Expériences sans CAA (panneau supérieur) ou en présence de Lysine 20 mM (panneau inférieur) dans la pipette de patch. **A)** Courants de transport d'arginine et d'histidine enregistrés sur une cellule exprimant PQLC2 (gauche) et une cellule non transfectée (droite). **B)** Gauche : Courbes I-V des courants évoqués d'arginine 20 mM (rouge) et histidine 20 mM (vert) obtenues à partir des traces de courant présentées en A sur une cellule PQLC2. Droite : Courbes I-V des courants évoqués d'arginine et d'histidine moyennés. **C)** Gauche : Courbes I-V des courants évoqués d'arginine 20 mM (rouge) et histidine 20 mM (vert) obtenues d'après les traces de courant présentées en A sur une cellule non transfectée. Droite : Courbes I-V des courants évoqués d'arginine et d'histidine moyennés.

6. Etude du couplage ionique de PQLC2 : approche thermodynamique par mesure du potentiel d'inversion

Le mécanisme d'uniport était une conclusion provisoire (la plus simple) de la première étude du couplage ionique de PQLC2 (Section 1 de ce chapitre). Il nous a semblé nécessaire de s'en assurer avant d'étudier de manière approfondie le mécanisme responsable de l'effet de mise sous silence de l'efflux interne de CAA par l'arginine externe. L'analyse du mécanisme de transport de PQLC2 par expression dans des ovocytes de Xénope combine la possibilité d'enregistrer les courants endogènes de l'ovocyte (ovocyte PQLC2 naïf) et celle de faire varier la concentration cytosolique en CAA au cours de la même expérience. Cette combinaison rend possible l'étude fine du couplage ionique de PQLC2 par la méthode des potentiels d'inversions.

6.1. Méthode de détermination du couplage ionique par l'étude des potentiels d'inversion

Si deux compartiments contiennent le(s) substrat(s)/ion(s) spécifique(s) d'un transporteur électrogénique donné et si la membrane qui sépare ces deux compartiments possède ce transporteur, alors il existe un potentiel où le nombre de transporteurs qui réalisent un cycle d'efflux égale le nombre de ceux qui réalisent un cycle d'influx. Le courant mesuré est alors nul. Le potentiel auquel cet équilibre se produit est le potentiel d'inversion.

Le flux net de molécules à travers un uniporteur est déterminé par le potentiel électrochimique transmembranaire ($\Delta\tilde{\mu}$) qui est la somme du potentiel électrique ($\Delta\Psi$) et du potentiel chimique (ΔG). Pour une molécule X, le potentiel électrochimique est donc égal à :

$$\Delta\tilde{\mu}_x = z_x \cdot F \cdot Em + R \cdot T \cdot \ln([X]_{in}/[X]_{out}) \quad (1)$$

z_x est la valence de X, F est la constante de Faraday, Em est le potentiel de membrane, R est la constante d'Avogadro, T est la température en Kelvin.

A l'équilibre, lorsque $\Delta\tilde{\mu}_x = 0$, cette équation peut être réduite à l'équation de Nernst. Le potentiel de membrane correspondant, c'est-à-dire le potentiel d'inversion (E_{inv}) vaut donc :

$$E_{inv} = -R \cdot T / (z_x \cdot F) \cdot \ln([X]_{in}/[X]_{out}) \quad (2)$$

De cette dernière équation, on peut déduire que lorsque $[X]_{in}$ ou $[X]_{out}$ est modifié, le potentiel d'inversion l'est également d'un facteur proportionnel à $[-R \cdot T / (z_x \cdot F)]$ dans une représentation semi-logarithmique .

Si la stœchiométrie du transport est plus complexe (couplage ionique avec un ion Y) l'équation (2) prend alors également en compte la concentration interne et externe de Y ainsi que sa charge électrique. La valence z_x est ainsi remplacée par la charge nette portée ($zx + zy$) dans un cycle de transport et l'équation (2) devient alors :

$$E_{inv} = -R \cdot T / ((zx + zy) \cdot F) \cdot \ln(([X]_{in} \cdot [Y]_{in}) / ([X]_{ou} \cdot [Y]_{out})) \quad (3)$$

Qui peut également s'écrire sous la forme :

$$E_{inv} = \frac{RT}{(zx + zy)F} \ln \left(\frac{[X]_{out} [Y]_{out}}{[X]_{in} [Y]_{in}} \right)$$

L'équation (3) est plus complexe, mais la conclusion générale de l'effet du changement de la concentration d'une des molécules transportées reste la même : elle va modifier le potentiel d'inversion du transport d'un facteur proportionnel à $[R \cdot T / ((zx + zy) \cdot F)]$ en représentation semi-logarithmique.

C'est cette dernière remarque que nous allons utiliser pour étudier la stœchiométrie et le couplage ionique de PQLC2.

6.2. Détermination du nombre de charge(s) couplée(s) au substrat par mesure du potentiel d'inversion

L'équation (3) indique qu'il n'est pas nécessaire de connaître les concentrations en CAA de part et d'autre de la membrane pour étudier leur relation avec le potentiel d'inversion. En effet, si la concentration dans un compartiment est fixe, il suffit de faire évoluer la concentration de la molécule considérée dans l'autre compartiment et d'analyser comment le potentiel d'inversion évolue pour déterminer le couplage ionique du transport. Or, nos expériences précédentes montrent que, dans nos conditions expérimentales, la vidange métabolique de l'arginine ou de la lysine dans l'ovocyte est faible. Ainsi, en accumulant une forte quantité de CAA à l'intérieur de l'ovocyte et en faisant varier la concentration de CAA externe rapidement, on peut caractériser la relation du potentiel d'inversion avec la concentration externe du CAA sans connaître sa concentration interne.

L'approche utilisée consiste donc à remplir l'ovocyte en arginine ou lysine à l'aide d'une longue application externe d'une concentration saturante (20 mM), puis de perfuser rapidement une gamme de concentration externe de ce CAA. Pour chaque condition (concentration interne fixe inconnue et gamme de concentrations externes connues), on pourra, à l'aide du système TEVC, mesurer le potentiel d'inversion du transport. L'analyse de l'évolution du potentiel d'inversion en fonction de la concentration externe permettra de déterminer le nombre charge(s) couplée(s) au transport d'une molécule de CAA.

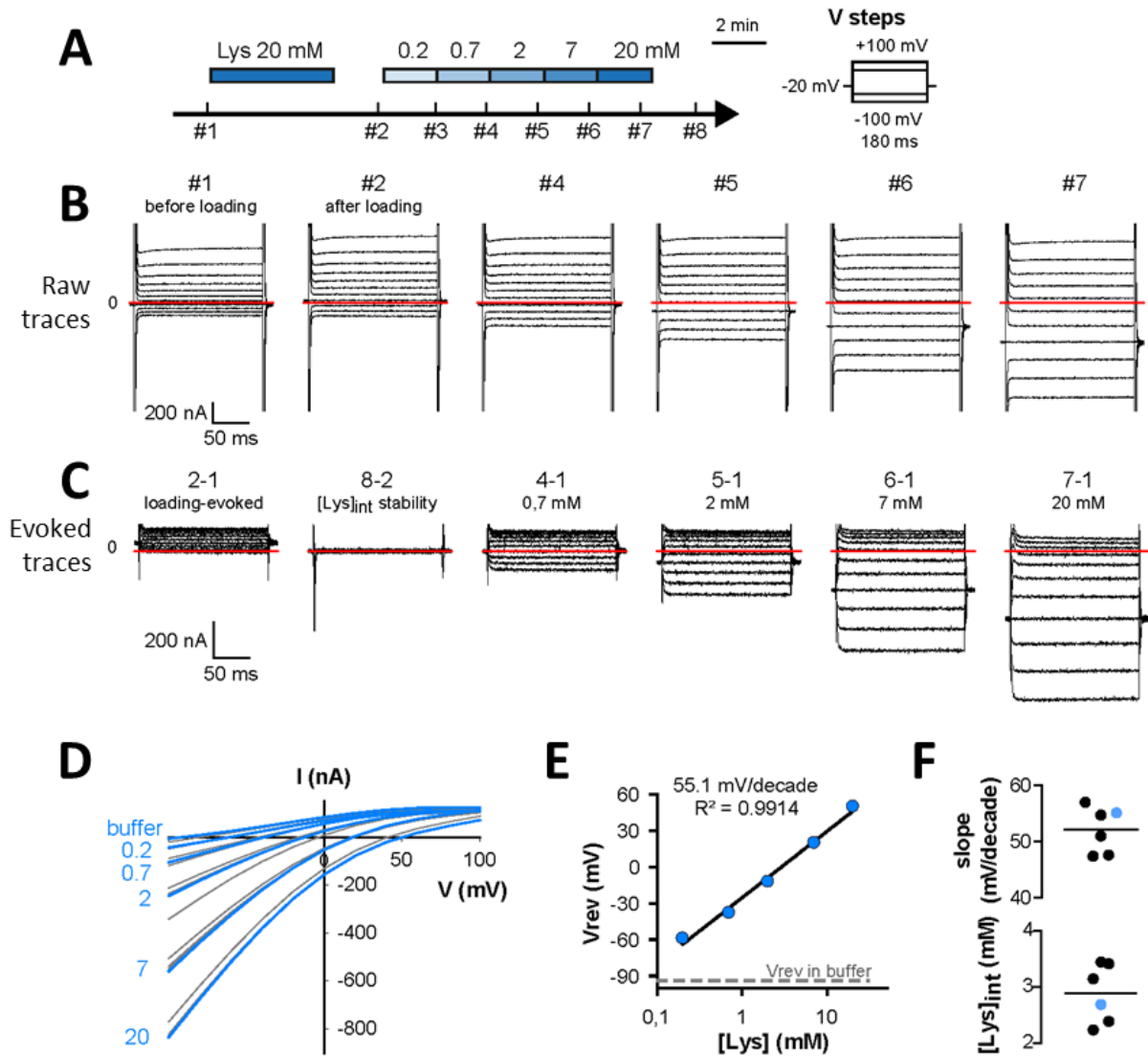


Figure 38 : Détermination du nombre de charge(s) couplée(s) au cycle de transport d'une molécule de lysine par la méthode des potentiels d'inversions.

A) Schéma détaillant le protocole utilisé. Les chiffres indiqués par le sigle « # » sur la frise chronologique représentent les instants où sont réalisés les sauts de potentiel. **B)** Traces brutes de courants enregistrées lors des différents sauts de potentiels. **C)** Traces évoquées de courants déterminées lors de la réalisation des différents sauts de potentiels. **D)** Courbes I-V des courants évoqués présentés en C (bleu). Les courbes I-V grises représentent les sauts de potentiel effectués toutes les 20 s entre chaque concentration appliquée. L'accumulation de plusieurs de ces courbes avec une courbe bleue, sélectionnée pour la mesure du potentiel d'inversion, montre que la solution perfusée s'est bien équilibrée au voisinage de l'ovocyte. **E)** Corrélation entre la concentration externe de lysine et le potentiel d'inversion du courant de transport de lysine évoqué à cette concentration. **F)** Haut : Analyse des pentes de la corrélation déterminée en E sur 6 expériences. Le point bleu correspond à la pente obtenue d'après les données brutes présentées dans cette figure. Bas : estimation de la concentration interne en lysine lors de la réalisation de l'expérience.

La **figure 38** présente les résultats obtenus avec la lysine. La gamme de concentration utilisée est 0.2, 0.7, 2, 7 et 20mM. La concentration en lysine appliquée dans le milieu a peu d'effet sur l'amplitude du courant sortant aux potentiels positifs. Il est donc facile de mesurer précisément le potentiel d'inversion pour chaque concentration.

Le protocole permet d'obtenir une concentration interne stable pendant l'application de la gamme de concentration externe (regarder les courants évoqués « 8 – 2 »). L'augmentation de la concentration externe d'un facteur dix décale le potentiel d'inversion de +52 +/-2 mV (n=6 ; **figure 38.F**). Ainsi, à 23°C, l'équation (3) permet d'estimer la charge nette (Z) associée au transport d'une molécule de lysine par PQLC2 :

$$Z = [(2,3 \cdot R \cdot T) / (E_{inv} \cdot F)] \cdot \log_{10} ([X]_{out} / [X]_{in}) = + 1.13 (+/- 0.04 ; n=6) \quad (4)$$

Le nombre de charge couplée au transport d'une molécule de lysine par PQLC2 est donc de +1.

La **figure 39** présente les résultats obtenus avec l'arginine. La gamme de concentration utilisée est 0.5, 1, 2, 5, 10 et 20 mM. Le protocole permet d'obtenir une concentration interne stable pendant l'application de la gamme de concentration externe (regarder les courants évoqués « 9 – 2 »). A nouveau, on observe une mise sous silence de l'efflux d'arginine interne par l'arginine externe. Cet effet est accentué quand la concentration de l'arginine externe est élevée jusqu'à devenir total à 20 mM. A cette concentration, la détermination du potentiel d'inversion est donc impossible.

L'augmentation de la concentration externe d'un facteur dix décale le potentiel d'inversion d'environ de +60 +/-1 mV (n=8). Ainsi, à 23 °C, l'équation (4) permet d'obtenir un nombre de charge couplée au transport d'une molécule d'arginine de +0.98 (+/- 0.03 ; n=8).

Ce résultat est en accord avec celui du rapport charge-substrat obtenu au début de ma thèse (+ 0.94). Le transport d'une molécule d'arginine ou de lysine est donc associé au passage d'une charge électrique positive.

6.3. PQLC2 n'est pas couplé aux ions Na⁺, K⁺, H⁺ et Cl⁻

Ces mesures ont donc confirmé celle rapportée dans la section 1 avec l'arginine radiomarquée, et elles ne révèlent aucune différence de comportement entre la lysine et l'arginine. L'hypothèse la plus simple pour rendre compte de cette valeur d'une charge élémentaire par acide aminé transporté est à nouveau celle d'un uniporteur. Cependant, contrairement à l'approche précédente, la possibilité d'une stœchiométrie plus complexe avec des ions se compensant mutuellement peut maintenant être examinée car on peut étendre l'approche des potentiels d'inversion pour examiner l'implication d'un ion particulier. Pour cela, il suffit de répéter les mesures en faisant varier la concentration de l'ion considéré.

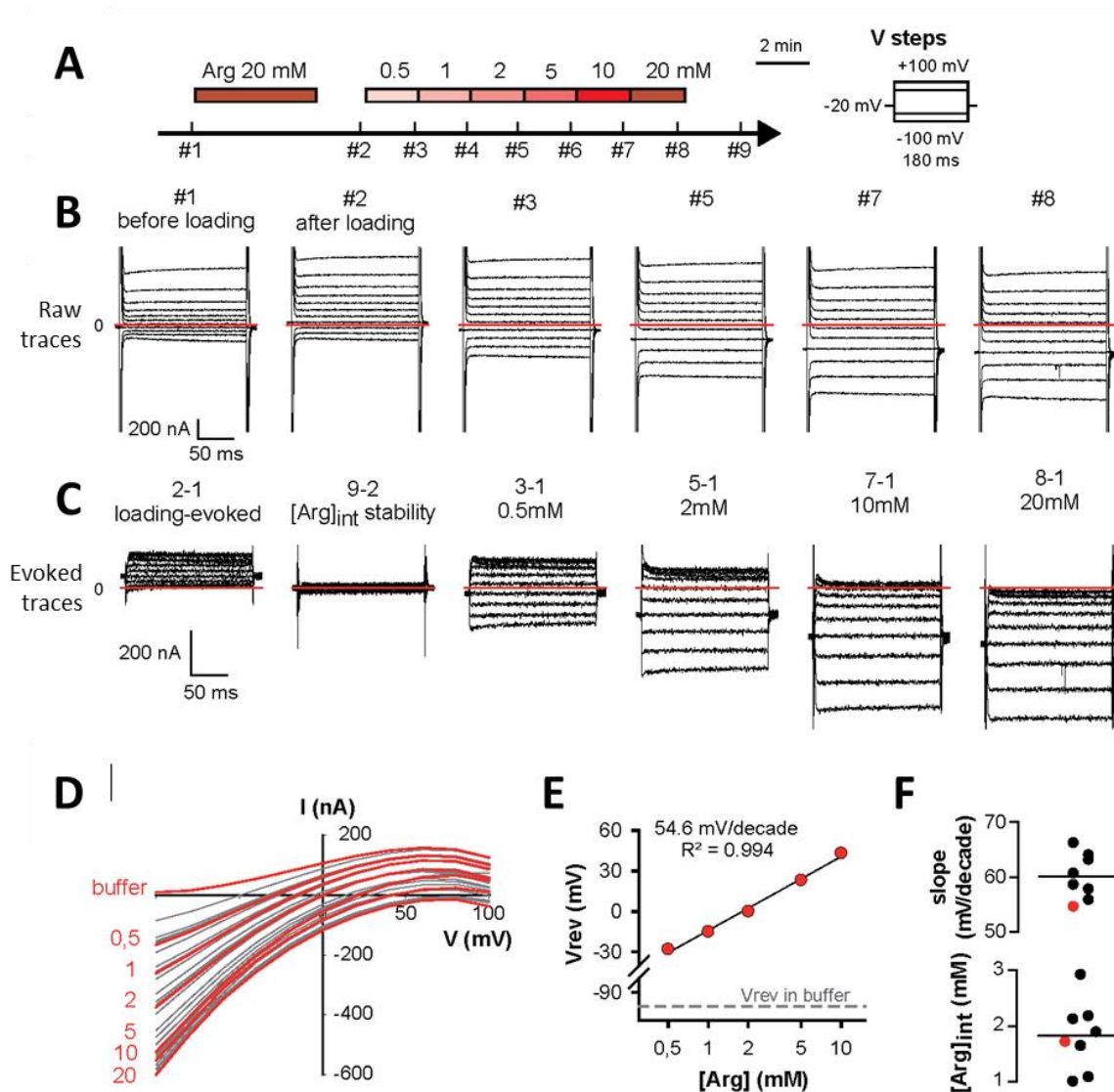


Figure 39 : Détermination du nombre de charge(s) couplée(s) au cycle de transport d'une molécule d'arginine par la méthode des potentiels d'inversions.

A) Schéma détaillant le protocole utilisé. Les chiffres indiqués par le sigle « # » sur la frise chronologique représentent les instants où sont réalisés les sauts de potentiel. **B)** Traces brutes de courants enregistrées lors des différents sauts de potentiels. **C)** Traces évoquées de courants déterminées lors de la réalisation des différents sauts de potentiels. **D)** Courbes I-V des courants évoqués présentés en C (rouge). Les courbes I-V grises représentent les sauts de potentiel effectués toutes les 20s entre chaque concentration appliquée. **E)** Corrélation entre la concentration externe d'arginine et le potentiel d'inversion du courant de transport d'arginine évoqué à cette concentration. **F)** Haut : Analyse des pentes de la corrélation déterminée en E sur 8 expériences. Le point rouge correspond à la pente obtenue d'après les données brutes présentées dans cette figure. Bas : estimation de la concentration interne en arginine lors de la réalisation de l'expérience.

Cette méthode a été appliquée aux quatre ions majoritairement utilisés comme source d'énergie par les transporteurs, à savoir les ions Na^+ , K^+ , H^+ et Cl^- et en utilisant la lysine comme substrat

Si l'ion testé est couplé au transport de CAA, le potentiel d'inversion doit être modifié lorsque le gradient de concentration de l'ion testé est modifié. Sinon il reste inchangé. Le principe de l'expérience est donc de mesurer en TEVC l'évolution du potentiel d'inversion du courant de transport de lysine suite à la modification de la concentration externe de l'ion testé.

Le protocole consiste tout d'abord à enregistrer les courants endogènes de références dans le milieu contrôle, puis dans un milieu où la concentration d'un ion a été modifiée (milieu test en l'absence de lysine ; ovocyte naïf). Ces références seront soustraites pour déterminer les courants évoqués par la lysine. Le contenu de l'ovocyte est ensuite chargé en lysine afin de saturer la « vidange métabolique ». Après avoir chargé l'ovocyte, on mesure le potentiel d'inversion du courant évoqué par 2 mM de lysine aux deux concentrations ioniques testées.

Le détail du contenu des solutions est décrit dans la partie « Méthodes ».

La concentration des protons a été modifiée d'un facteur 10 (pH 6.00 vs pH 5.00). Si ces ions sont couplés au cycle de transport à raison d'un proton par molécule de lysine, le décalage du potentiel d'inversion sera de -58.7 mV (calculé d'après (3) à 23 °C).

La concentration des ions sodiums a été modifiée d'un facteur x100 (1 mM vs 100 mM). Si ces ions sont couplés au cycle de transport avec une stœchiométrie de 1, le décalage du potentiel d'inversion sera de -117.4 mV (2×58.7). Le Na-Cl a été remplacé par du NMDG-Cl (100 mM) pour maintenir l'osmolarité de la solution.

La concentration des ions potassiums a été modifiée d'un facteur x30 (60 mM vs 2 mM). Si ces ions sont couplés au cycle de transport avec une stœchiométrie de 1, le décalage du potentiel d'inversion sera de +86.7 mV ($\log(30) \times 58.7$).

La concentration des ions chlorures a été modifiée d'un facteur x11 (10 mM vs 110 mM). Si ces ions sont couplés au cycle de transport avec une stœchiométrie de 1, le décalage du potentiel d'inversion sera de +61.1 mV ($\log(11) \times 58.7$).

Les résultats obtenus sont présentés en **figure 40**.

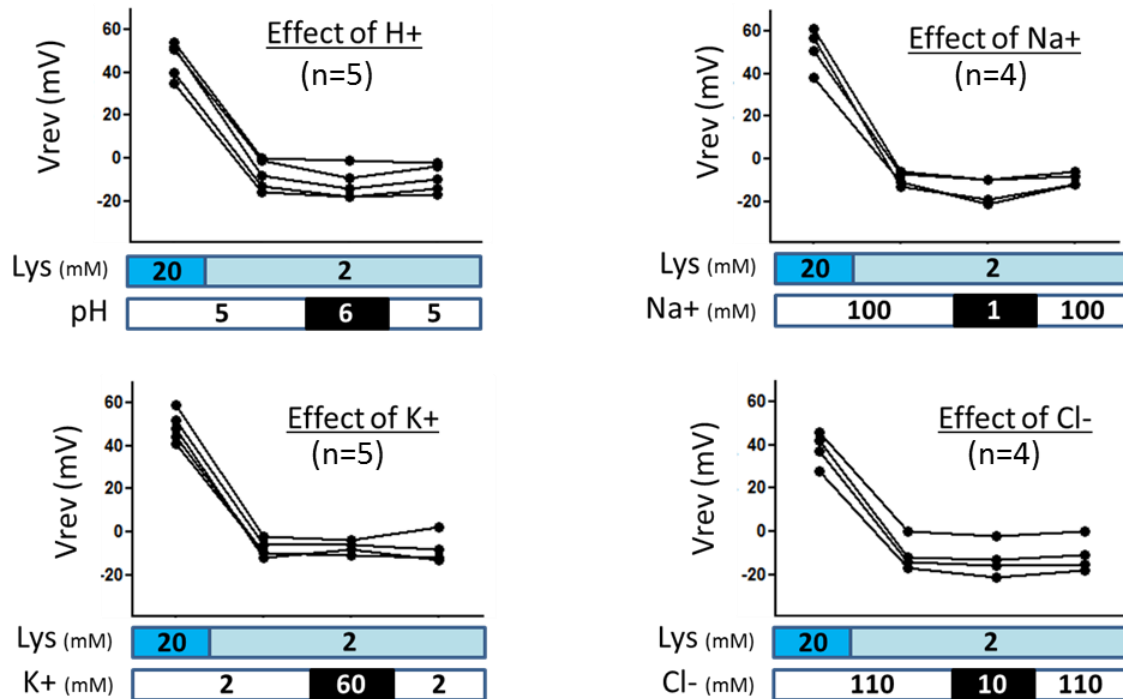


Figure 40 : Effet de la modification des gradients de concentration en Na^+ , K^+ , H^+ et Cl^- sur le potentiel d'inversion du courant de transport de lysine.

Aucune substitution ionique n'a eu d'impact sur le potentiel d'inversion du transport de lysine. PQLC2 n'est donc pas couplé à ces ions. C'est donc un uniporteur ou, éventuellement, un canal sélectif des acides aminés cationiques.

Bien que cela n'affecte pas la conclusion de ces expériences, il convient de noter que les substitutions ioniques effectuées altèrent quand même l'amplitude du courant de transport. L'ajout d'une grande quantité de NMDG (20 mM vs 120 mM lors du remplacement du Na^+) est en effet associé à une forte inhibition du courant de transport de lysine (61 +/- 3% d'inhibition à -60 mV ; n=4) (**figure 41.A**). Cette inhibition n'est pas due à la perte du sodium car la substitution de la totalité des ions sodiums par du potassium n'affecte pas le courant de transport induit par 20 mM d'Arg (**figure 41.A, droite**). L'effet d'une différence de concentration en ions NMDG dans l'étude de l'effet des ions potassiums (78 mM dans la solution contrôle vs 20 mM) est également associé à une inhibition du courant de transport de lysine (42 +/- 2 % d'inhibition à -60 mV ; n=5). Cette inhibition pourrait être due à une interaction du NMDG^+ avec le site de liaison des CAA de PQLC2. Soulignons que cet effet ne remet pas en question le résultat des mesures de potentiel d'inversion car il s'agit de mesures thermodynamiques, qui ne dépendent pas du nombre de molécules de transporteur impliquées.

L'effet du gluconate utilisé dans les expériences de substitution du chlore (ajout de 100 mM) est peut-être non spécifique (**figure 41.B**). Le courant de transport de lysine est inhibé de 30+/-2 % à 60 mV (n=4). Une fois encore cela n'affecte pas le résultat des mesures de potentiel d'inversion.

Enfin le pH a également un effet sur la dépendance au potentiel du transport. Comme cela avait déjà été décrit, l'acidification externe active l'influx médié par PQLC2, mais il active aussi l'efflux (**figure 41.C**). Les protons externes (lysosomaux) exercent donc un contrôle allostérique sur PQLC2 bien qu'ils ne soient pas couplés à la réaction de transport.

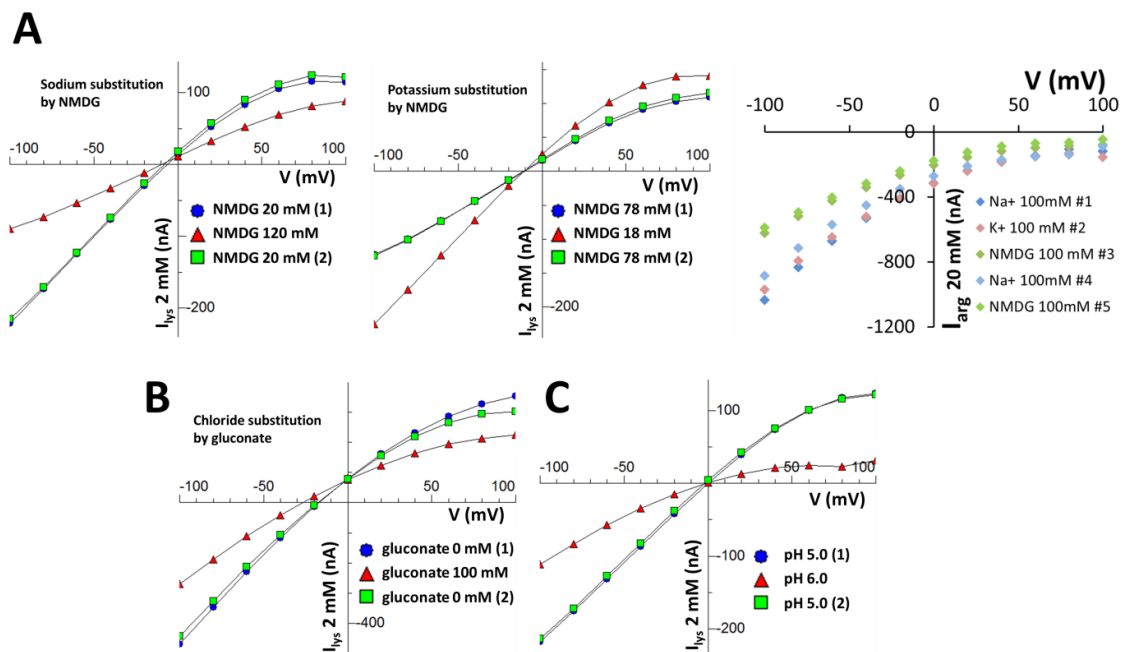


Figure 41 : Effet du NMDG, du gluconate et du pH externe sur le courant de transport évoqué par la lysine 2 mM.

Les résultats sont présentés sous la forme de courbes I-V obtenues dans une expérience représentative. Deux solutions contrôles encadrent une solution dont la concentration de la molécule testée a été modifiée. **A**) Le NMDG à forte concentration inhibe le courant de transport de lysine médié par PQLC2. Gauche : expérience de substitution de 100 mM de sodium par du NMDG. Milieu : expérience de substitution de 58 mM de potassium par du NMDG. Droite : comparaison de l'effet de la substitution de 100 mM de sodium par du potassium (rose) ou du NMDG (vert) sur la dépendance au potentiel du courant de transport d'arginine (la condition contrôlée est en bleu). **B**) Effet de la substitution de 100 mM d'ions chlorures par du gluconate. **C**) Effet du pH externe.

7. Symétrie fonctionnelle de l'effet de mise sous silence par l'arginine

La plupart des expériences réalisées sur des ovocytes de Xénopes sont associées à une baisse systématique de l'amplitude des courants entrants aux potentiels négatifs. Cette observation suggère que l'effet d'extinction du courant par l'Arg puisse être réversible puisque nous avons montré par ailleurs que l'arginine s'accumule dans l'ovocyte pendant la perfusion. Autrement dit, si l'Arg externe rend silencieux le courant sortant des CAA internes à potentiel positif, il se pourrait que, réciproquement, l'Arg interne puisse éteindre le courant entrant associé à l'entrée de CAA externe.

7.1. *Protocole*

Pour tester cette hypothèse, le protocole mis en place consiste à mesurer, à potentiel constant (-60 mV), l'amplitude des courants entrants évoqués par de la lysine 20 mM avant et après un remplissage soutenu de l'ovocyte en arginine ou lysine. Le remplissage consiste à appliquer l'un ou l'autre de ces substrats à 20 mM dans le bain durant 15 min. La concentration interne de l'ovocyte en Arg ou Lys est estimée par intégration du courant de transport enregistrée sur toute l'expérience (on néglige donc leur métabolisation). Les résultats sont présentés en **figure 42**.

7.2. *Résultats*

Que ce soit pour le protocole de remplissage en Lys ou en Arg, l'amplitude du courant entrant de la perfusion test de Lys 20 mM est réduite par le remplissage de l'ovocyte (**figure 42.A**). Cette baisse est prévisible car, avec le remplissage progressif de l'ovocyte, le gradient électrochimique des CAA va diminuer. Cependant, bien que le remplissage en Arg (4.3 mM +/-0.2 ; n=5) soit moindre qu'en Lys (8.1 mM +/-0.4 ; n=5 ; **figure 42.B**, droite ; p=0.0079), l'Arg interne réduit beaucoup plus l'amplitude du courant test (75 % +/-2 ; n=5) que la lysine (32 % +/-5 ; n=5 ; **figure 42.B**, gauche p=0.0079). Ainsi, l'effet de mise sous silence du courant de transport des CAA par l'acide aminé présent en position *trans* se produit dans les deux sens de transport, et il est sélectif de l'arginine.

On notera d'ailleurs que l'effet de mise sous silence intervient très rapidement dès le début de la phase de remplissage de l'ovocyte en Arg (*cf* flèche de la **figure 42.A**). Il est même fortement probable que cette diminution liée à l'arginine soit encore plus importante si on considère que l'amplitude du courant entrant d'arginine 20 mM au début du remplissage doit au moins être identique à celui du premier test de lysine 20 mM (comparer l'amplitude des courants de Lys 20 mM et Arg 20 mM dans les expériences de patch clamp, **figure 33.C**).

Cette expérience ne permet pas de trancher la question d'une symétrie totale ou partielle de l'effet de mise sous silence. Les conditions de son étude dans le cadre de l'efflux (Arg 20 mM à l'extérieur et concentration en CAA inférieure à 10 mM dans l'ovocyte) diffèrent trop de celles utilisées dans le cadre de l'influx (Arg inférieur à 10mM dans l'ovocyte et concentration en CAA à 20 mM à l'extérieur). Des expériences supplémentaires sont nécessaires pour évaluer ce point.

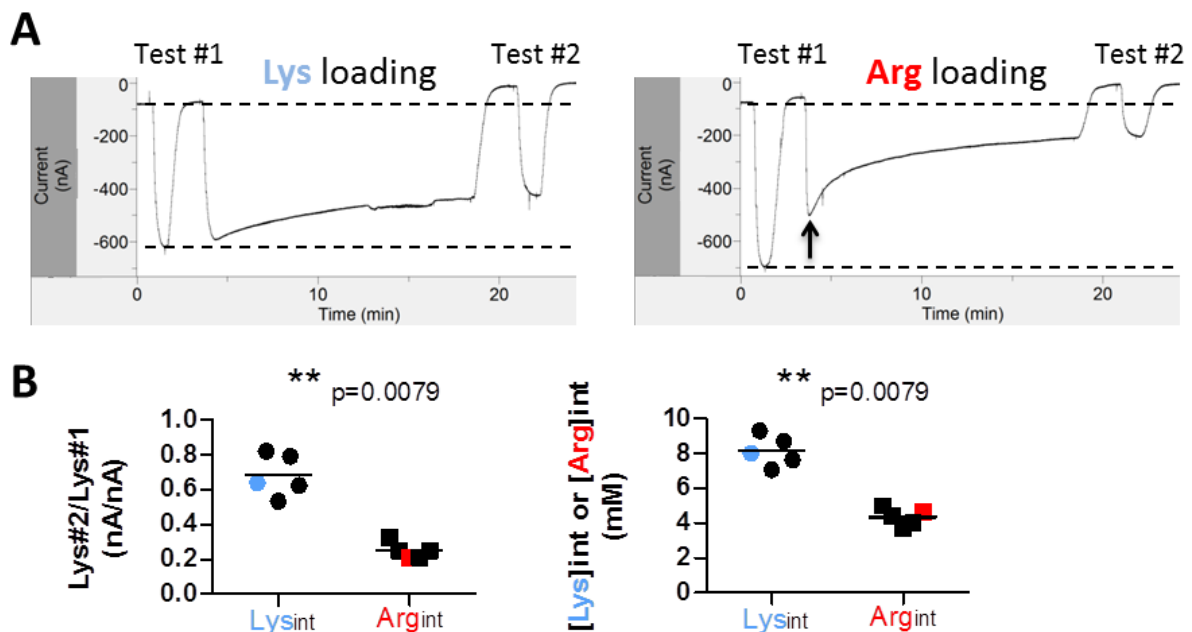


Figure 42 : Seule l'arginine interne met sous silence les courants entrants de transport d'acides aminés cationiques externes.

A) Traces de courant à -60 mV d'un protocole de remplissage en lysine (gauche) et arginine (droite). Noter la vitesse à laquelle l'amplitude du courant arginine décroît (flèche noire). **B**) Gauche : rapport d'amplitude entre le test #2 et le test #1 obtenu sur différents ovocytes pour chaque protocole. Droite : concentration estimée après le remplissage en Lys ou Arg sur différents ovocytes. Test statistique utilisé : Mann Whitney.

8. Conclusions et perspectives

Mes résultats sur l'étude du couplage ionique indiquent clairement que PQLC2 est un uniporteur. Il n'est pas couplé aux protons contrairement à la majorité des transporteurs du lysosome et est fortement influencé par le potentiel. Enfin, l'étude du courant paradoxal associée à la découverte d'un effet de mise sous silence spécifique du transport de CAA par l'arginine présente en *trans*, et ce quel que soit le sens du transport, est un élément important du mécanisme de PQLC2. qui pourrait être directement lié à une fonction biologique dont le messager est l'arginine.

Ces travaux ont été réalisés sur la protéine PQLC2 de rat, il faudra aussi s'assurer que ces propriétés sont conservées chez l'Homme et la Souris. Le protocole décrit en **figure 45** pourra d'un seul tenant répondre à cette question.

Je vais maintenant discuter le mécanisme possible de cet effet *trans* de l'arginine. Sa fonction biologique possible sera abordée dans la conclusion générale du mémoire.

8.1. *Hypothèse de travail*

Comme présenté précédemment, deux types d'hypothèses peuvent être invoquées pour expliquer la suppression du courant d'efflux par l'arginine 20 mM :

- 1) l'arginine inhibe PQLC2, par exemple par un contrôle allostérique
- 2) l'arginine supprime le courant, mais pas le flux de CAA qui se poursuivrait sous une forme électroneutre, donc indétectable en TEVC.

La première hypothèse serait vraiment surprenante car elle stipulerait que l'arginine possède deux sites allostériques inhibiteurs présents sur les deux faces du transporteur. Néanmoins à ce stade de niveau de preuves, on ne peut pas l'écarter.

La deuxième hypothèse peut être expliquée relativement simplement par l'effet de *trans*-stimulation observé fréquemment chez les transporteurs secondaires (voir la section correspondante du chapitre « Introduction »). La propriété originale de PQLC2 est que cet effet est sélectif de l'arginine comparé aux deux autres acides aminés cationiques, alors que le transport proprement dit est comparable pour ces trois substrats.

En condition *zéro-trans*, PQLC2 fonctionne comme un uniporteur quel que soit le CAA présent dans le compartiment *cis* et quelle que soit la localisation (cytosolique ou externe) du CAA (**figure 43**). Seul le gradient électrochimique du CAA dicte la vitesse de transport.

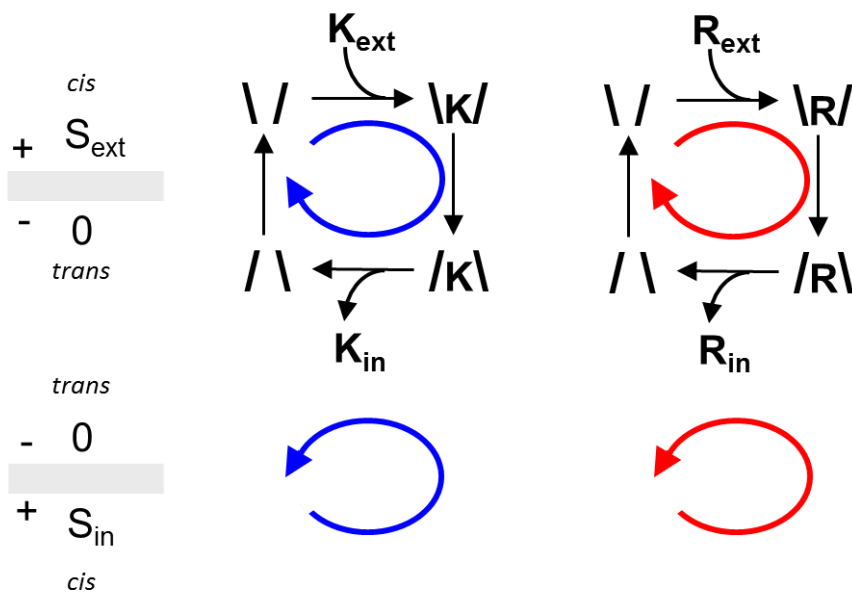


Figure 43 : En condition zéro-*trans*, PQLC2 fonctionne comme un uniporteur indépendamment du CAA transporté. « S » représente n'importe quel acide aminé cationique.

La présence de lysine dans le compartiment *trans* n'affecte pas le mode de transporteur de PQLC2. Le retour à vide du transporteur est ainsi plus rapide (ou au moins aussi rapide) que lorsqu'il est lié à la lysine-*trans*.

En revanche, lorsque l'arginine est dans le compartiment *trans*, le retour à vide du transporteur est plus lent que lorsqu'il est lié à l'arginine-*trans* (**figure 44**). Le cycle de transport de PQLC2 passe alors par un échange CAA_{cis}/Arg_{trans} . Comme ces deux molécules possèdent une charge positive, le cycle est électroneutre. L'application longue d'arginine sur des ovocytes PQLC2 va ainsi se traduire par une augmentation de la concentration interne en arginine et donc à une augmentation progressive de la part de transporteurs impliqués dans cet échange électroneutre. Le courant mesuré en TEVC durant cette application va donc diminuer avec le temps (**figure 45**).

La propriété de *trans*-stimulation présuppose que l'étape à vide du transporteur soit limitante (voir la section correspondante du chapitre « Introduction »). Dans le cadre de l'influx, en condition zéro-*trans*, le flux d'arginine (R) et de la lysine (K) est similaire quelle que soit la valeur du potentiel électrique de membrane (expériences de patch clamp sans CAA dans la pipette, **figure 33**). Ce résultat va de pair avec une étape limitante commune dans le cycle de transport de K et R, qui peut très bien correspondre au retour à vide du transporteur. Mes résultats dans le sens de l'efflux ne sont pas assez précis pour permettre d'arriver à cette observation.

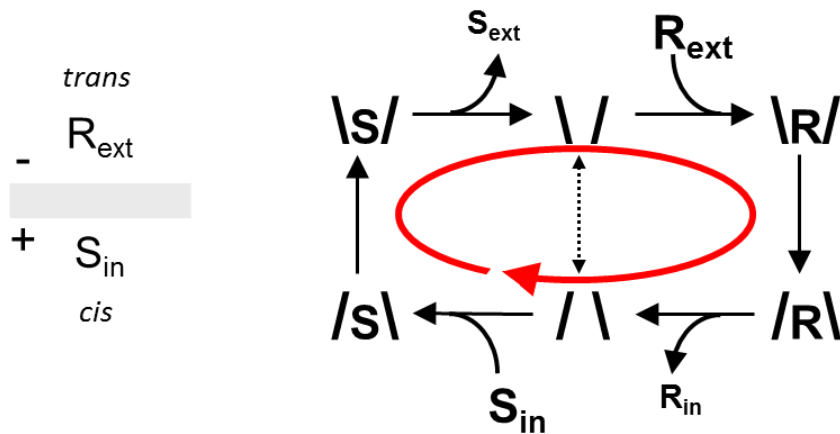


Figure 44 : L'arginine-*trans* permettrait la *trans*-stimulation de PQLC2. Le flux de transport d'acides aminés cationiques (« S ») est déterminé par le gradient électrochimique des CAA. Le choix du sens du flux est arbitraire sur ce schéma.

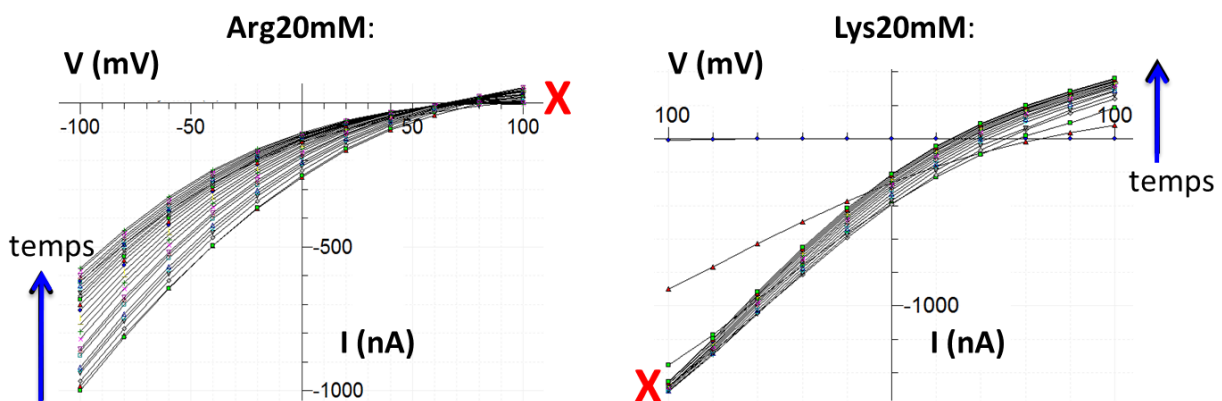


Figure 45 : Comparaison de l'effet d'une perfusion prolongée d'arginine ou de lysine sur les courbes I-V du transport médié par PQLC2.

Le courant de transport de PQLC2 en fonction du potentiel est enregistré toute les 20 secondes pendant l'application d'arginine 20 mM (gauche) ou de lysine 20 mM (droite). Les graphiques représentent l'évolution de ces courbes I-V avec le temps.

Le remplissage de l'ovocyte par la lysine est associé à une baisse légère du courant entrant à potentiel négatif et à une forte augmentation du courant d'efflux à potentiel positif. Le remplissage de l'ovocyte par l'arginine induit une forte diminution du courant entrant à potentiel négatif lié à l'augmentation du nombre de transporteurs qui passent d'un cycle d'uniport à un cycle d'échange Arg/Arg électroneutre. A potentiel positif, l'efflux n'est pas visible car tous les transporteurs utilisent l'Arg externe à concentration saturante pour se réorienter vers le compartiment interne (la légère augmentation de l'amplitude des courants à potentiel positif est transitoire et probablement liée aux canaux endogène de l'ovocyte).

La différence de comportement entre l'arginine et la lysine (ou l'histidine) proviendrait donc d'une différence de vitesse de l'une des trois étapes qui implique le substrat (liaison, transconformation du transporteur lié au substrat, dissociation). Il est classiquement considéré que les étapes de liaison et de dissociation sont beaucoup plus rapides que les étapes de transconformation. Cependant, étant donné que l'affinité de la Lys est plus faible que celle de l'Arg (voir le chapitre « Introduction » ; attention, l'affinité en fonction du potentiel peut varier et n'a jamais été étudiée), il faudra trancher entre ces trois possibilités en réalisant des expériences adaptées.

8.2. Perspectives

Inhibition ou trans-stimulation sélective ?

Un point important qui n'a pas pu jusqu'alors être tranché dans le temps de ma thèse est l'origine (inhibition ou *trans*-stimulation sélective) de la propriété de mise sous silence de l'arginine. De nombreux indices obtenus sur des expériences complémentaires rejettent l'hypothèse de l'inhibition et vont dans le sens de la trans-stimulation. Je n'en présenterai ici qu'une seule.

Cette expérience consiste à remplir un groupe d'ovocytes PQLC2 avec de la [³H]-Arg et de la [¹⁴C]-Lys puis de réaliser une cinétique d'efflux dans un milieu à pH 5.0 contenant ou non une concentration saturante en Arg 20 mM (**figure 46**). On ne contrôle pas le potentiel de ces ovocytes, cette expérience n'étant pas réalisée en TEVC.

L'accumulation de [³H]-Arg et de [¹⁴C]-Lys (influx) dans les ovocytes est spécifique de PQLC2 (pas de transport endogène, regarder les courbes mock). L'efflux est également uniquement médié par PQLC2 (lorsque PQLC2 est inactif, l'efflux est stoppé ; regarder les traces à pH 7.4). L'efflux est net dans le milieu à pH 5.0 sans arginine, pour la [³H]-Arg et pour la [¹⁴C]-Lys.

Si l'effet de mise sous silence par l'arginine est un effet inhibiteur, alors l'ajout d'arginine dans le milieu externe devrait ralentir l'efflux. Or, ces résultats montrent clairement que ce n'est pas le cas. L'efflux de [³H]-Arg et de [¹⁴C]-Lys est même augmenté, comportement caractéristique d'une *trans*-stimulation.

Nous sommes en train d'élaborer un protocole qui permettra de trancher définitivement cette question. L'analyse par spectrométrie de masse du contenu en CAA d'un ovocyte détecte nettement leur présence. De plus, ces valeurs sont relativement stables d'un ovocyte à l'autre. En TEVC, à potentiel très négatif (-60 mV), suite à l'application d'un isotope stable de Lys (différent de celui de la Lys endogène) dans le milieu, on doit s'attendre à une baisse sélective du contenu de l'ovocyte PQLC2 en Arg, mais pas en Lys. Une première expérience nous a permis de valider la détection de l'accumulation de la Lys externe dans l'ovocyte. De plus, sur ces mêmes ovocytes, le niveau d'Arg a également dramatiquement diminué. Nous n'avons pas utilisé d'isotope stable de Lys pour cette expérience préliminaire. Cependant, nous avons bon espoir que le niveau de Lys endogène n'ait pas

été affecté. Cette expérience démontrerait l'échange sélectif de l'influx de CAA externe par de l'Arg interne à potentiel négatif.

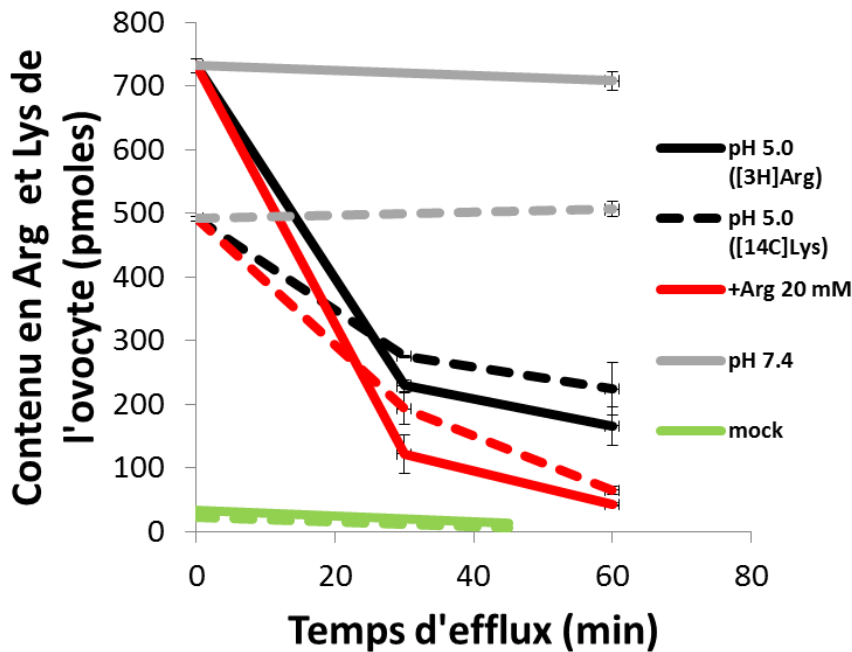


Figure 46 : Cinétique d'efflux de [3H]-Arg et de [14C]-Lys contenu dans des ovocytes mis à incuber dans un milieu pH 5.0 contenant ou non 20 mM d'arginine.

Les traces continues correspondent à la cinétique d'efflux de [3H]-Arg en présence (rouge) ou en absence (noir) d'arginine 20 mM dans le milieu. Les traces en pointillés correspondent à la cinétique d'efflux de [14C]-Lys. Les traces grises correspondent aux cinétiques d'efflux dans du tampon pH7.4. Les traces vertes correspondent à des ovocytes qui n'expriment pas PQLC2 (bruit de fond). Chaque point représente un groupe minimum de 3 ovocytes.

Différence d'affinité ou d'énergie d'activation ?

Il existe trois étapes qui pourraient prétendre d'être à l'origine de la différence de comportement entre la Lys et l'Arg contenue dans le compartiment *trans* : la liaison à PQLC2, l'énergie d'activation nécessaire pour sa translocation par PQLC2, ou la dissociation de PQLC2. L'étude de la dépendance au potentiel de PQLC2 vis-à-vis du transport de l'Arg ou de la Lys peut être faite par des expériences de saturation aux différents potentiels (c'est le cas de l'expérience présentée en **figure 27.B**).

L'ovocyte ne semble pas être le meilleur modèle pour réaliser ces expériences car il métabolise très peu la Lys et l'Arg. Chaque concentration testée apporterait donc son lot de CAA interne qui impacterait le signal enregistré sur la suite de la gamme de concentration testée. Il est peut-être possible de trouver un ensemble de conditions qui rendent son étude réalisable. Par exemple en améliorant le système de perfusion (comme dans le cadre des expériences de patch clamp), en

diminuant le nombre de molécules de PQLC2 présentes à la membrane de l'ovocyte (injection d'une quantité plus faible d'ARNc PQLC2-LL/AA-EGFP), en imposant un potentiel de repos entre les sauts de potentiel plus élevé (0 mV ; au-delà, l'ovocyte est instable). Cette étude pourrait également être faite en patch clamp sur des cellules HEK qui expriment PQLC2. Cependant les signaux sont trop faibles et les courants enregistrés aux potentiels positifs sont très instables. Dans le cas de ces deux approches, l'affinité du côté cytosolique ne pourrait pas être déterminée. Finalement, des approches comme la technologie SURFE2R développée par nanji[on qui permettent de contrôler les deux compartiments qui font face à la membrane dans laquelle PQLC2 est enchâssé permettraient peut-être de répondre aux besoins spécifiques de cette expérience.

Origine de la *trans*-stimulation sélective ?

La sélectivité pour l'Arg du phénomène de *trans*-stimulation vient probablement d'une interaction différente de la Lys ou de l'Arg avec PQLC2. De nombreux critères chimiques peuvent expliquer cette différence comme par exemple la longueur de la chaîne latérale, la flexibilité de la chaîne latérale ou encore la nature du groupement chimique de la chaîne latérale qui porte la charge positive. La mutation de résidus de PQLC2 susceptibles d'interagir avec la Lys ou l'Arg permettrait alors d'élargir la spécificité de l'effet de *trans*-stimulation à la Lys, ou tout simplement de la supprimer.

La modélisation du transport est nécessaire

La quantité d'informations sur les propriétés de PQLC2 est suffisante pour débiter la modélisation du transport sur informatique. Ce travail a été initié dans mon équipe. Le logiciel utilisé dans ce but, nommé « State Editor », a été développé par Michael Pusch, Directeur de l'Institut de Biophysique de Gênes (Italie). Je n'ai pas pu participer à sa mise en place. Les résultats obtenus sont encore trop préliminaires pour les introduire ici.

Valider ces propriétés à l'échelle du lysosome

Mon laboratoire maîtrise les approches biochimiques de purification de lysosomes. L'utilisation de CAA estérifié permet de charger le contenu intra-lysosomal en CAA. Il est donc possible de tester, par l'utilisation de ces composés radiomarqués, les effets de *trans*-stimulation dans les deux sens de flux dans l'environnement naturel de PQLC2.

Dans leurs études, Pisoni et al. observent dans des préparations de lysosomes purifiés à partir de fibroblastes humains, que le système de transport des CAA du lysosome est *trans*-stimulable par la Lys et l'Arg. Cependant, il n'ont jamais mis en compétition ces deux composés (Pisoni, Thoene and Christensen, 1985; Pisoni *et al.*, 1987). Il sera donc intéressant de réaliser cette expérience pour confirmer, ou non, le caractère préférentiel de *trans*-stimulation de l'Arg, comparé à la Lys, quand PQLC2 est présent dans la membrane du lysosome. D'autant plus que nous possédons maintenant des souris sauvages et KO pour le gène PQLC2 (voir le chapitre 2). Il sera donc possible de savoir si ces réponses sont spécifiques de PQLC2 chez la souris.

Chapitre 2 : Rôle physiologique de PQLC2

Au sein du laboratoire, la production d'un modèle murin délété (Knock Out : KO) pour *Pqlc2* a été initiée pour permettre le développement de nombreux axes de recherches rendus possibles par l'identification de la fonction de PQLC2 en 2012.

Le premier axe, qui est à l'origine d'une partie du financement de ma thèse par la Cystinosis Research Foundation, est l'étude de l'implication de PQLC2 dans le traitement de la cystinose par la cystéamine à l'échelle de l'organisme. A l'échelle de la cellule, le rôle pharmacologique de PQLC2 comme voie de sortie principale du disulfure mixte cystéine-cystéamine du lysosome (et donc de la déplétion en cystine des cellules) a été clairement démontré sur une lignée cellulaire de fibroblastes de patients cystinotiques immortalisés (Jézégou *et al.*, 2012). Jusqu'à présent, chez le mammifère, aucune étude n'a été réalisée à l'échelle de l'organisme. On ne sait pas, par exemple, si l'effet de la déplétion en cystine par la cystéamine dépend de PQLC2 dans tous les organes ou tissus. Il est également possible que PQLC2 joue un rôle dans les mécanismes de compensations associés à la perte de la cystinosine. Comme le modèle murin KO pour *Ctns*, le gène codant pour la cystinosine, existe déjà (Cherqui *et al.*, 2002), la production du modèle KO *Pqlc2*, puis du modèle double KO *Pqlc2-Ctns* par croisement de ces deux lignées donnera un outil puissant pour étudier ces questions.

Un autre axe est directement issu de la fonction de PQLC2 en tant que transporteur lysosomal d'acides aminés cationiques. Comme la plupart des transporteurs du lysosome, son altération peut être à l'origine d'une pathologie lysosomale (Ruivo *et al.*, 2009). Dès lors, l'étude du modèle murin KO *Pqlc2* permettra peut-être d'obtenir un tableau clinique de symptômes retrouvés dans une maladie orpheline, ouvrant ainsi la voie au développement de traitements qui lui sont spécifiques.

Enfin, PQLC2 peut être impliqué dans de grandes voies métaboliques ou de signalisations faisant intervenir les acides aminés cationiques. Le rôle de recyclage de l'arginine lysosomale est particulièrement intéressant. En effet, l'arginine est une molécule de signalisation importante qui influence le complexe mTORC1 et par conséquent régule finement l'autophagie (Wang *et al.*, 2015).

1. Le modèle murin *Pq1c2* -/-

Dans cette section, je vais tout d'abord présenter les différentes étapes qui nous ont permis de produire les souris KO *Pq1c2* (autrement appelées *Pq1c2* -/-). Je présenterai ensuite les premiers résultats de phénotypage du modèle.

1.1. Production du modèle murin *Pq1c2* -/-

La production du modèle murin KO *Pq1c2* s'est faite en deux phases. Il a fallu tout d'abord produire les souris chimériques porteuses de la délétion, puis faire reproduire ces souris pour espérer obtenir des souris hétérozygotes pour la mutation. Ces souris hétérozygotes, viables, fertiles et ne présentant aucun phénotype visible, ont été croisés entre elles, permettant ainsi d'obtenir des souris homozygotes pour la mutation appelées souris KO *Pq1c2*.

Production des souris chimériques porteuses de la mutation pour *Pq1c2*

La première étape de ce processus consiste à inactiver le gène *Pq1c2* dans des cellules souches embryonnaires (cellules ES : Embryonic Stem cells) murines (*Mus musculus*). Cette étape a été réalisée dans le cadre du consortium « Knock Out Mice Project, KOMP » (www.komp.org) financé par le *National Institutes of Health*. Ce programme a entrepris l'inactivation systématique de gènes dans des cellules ES murines. *Pq1c2* faisait partie des gènes ciblés. Une seconde étape initiée et financée par mon laboratoire a consisté à produire les souris chimériques porteuses de la délétion de *Pq1c2*. Ce projet a été sous-traité à l'UC Davis Mouse Biology Program (University of California).

La délétion de *Pq1c2* (projet VG11557) s'est faite par recombinaison homologue en utilisant l'approche VelociGene sur des cellules souches embryonnaires de souris de fond génétique C57BL/6N (voir le chapitre « Méthodes »). La cassette de délétion est introduite dans des cellules souches embryonnaires murines de fond génétique C57BL/6NTac. Lorsqu'une recombinaison se produit, les cellules ES deviennent hétérozygotes pour l'allèle mutée *Pq1c2*^{tm1(KOMP)V1cg}. Nous avons acheté 3 clones de cellules ES *Pq1c2*^{tm1(KOMP)V1cg}.

Ces clones ont été injectés dans des blastocystes de souris receveuses de fond génétique BALB/c. La différence de fond génétique entre les cellules souches embryonnaires et les cellules du blastocyste permettent par la suite d'estimer le degré de chimérisme de la progéniture par observation de la couleur des poils. En effet, le fond génétique C57BL/6NTac donne des souris à pelage noir tandis que les souris BALB/c ont un pelage blanc. Plus le pelage est noir, plus les cellules mutées pour le gène *Pq1c2* auront colonisés les organes et donc, plus les gamètes seront susceptibles de posséder la mutation. Nous avons sous-traité la production de souris chimérique à l'UC Davis à partir des 3

clones de cellules ES *Pq1c2^{tm1(KOMP)Vlcg}*. Cette étape a fourni 7 mâles chimériques qui ont été transférés à notre animalerie au Centre Universitaire des Saints-Pères à l'âge de deux mois. J'ai pu ensuite les étudier et les faire se reproduire.

Production des souris *Pq1c2* hétérozygotes sur fond génétique C57BL/6N

Les 7 mâles chimériques ont été mis en accouplement avec des femelles sauvages de fond génétique C57BL/6N provenant de chez Janvier. Les mâles chimériques sont susceptibles de produire des gamètes de fond génétique BALB/c ou C57BL/6N. La progéniture issue de ces croisements sera donc soit de fond mixte C57BL/6N - BALB/c, soit de fond pur C57BL/6N.

Il est possible de connaître le fond génétique de chaque individu issu de ce croisement en fonction de la couleur de son pelage. Dans notre cas, celle-ci est due à l'interaction entre 2 gènes, nommée A et C. Le gène C rend possible (allèle C, dominant) ou empêche (allèle c, récessif, phénotype albinos) la présence de pigments au niveau des poils. Le gène A agit sur la position des pigments au niveau du poil. Son effet n'est observable que si la souris possède au moins une copie de l'allèle C. L'allèle A induit la présence d'une bande jaune sur la tige du poil, ce qui lui donne un aspect poivre et sel (phénotype Agouti). L'allèle a donne une localisation homogène du pigment noir (mélanine) sur le poil.

Les souris C57BL/6N de phénotype noir ont un génotype C/C a/a. Les souris BALB/c de phénotype albinos ont un génotype c/c A/A. La **figure 47** donne le génotype et le phénotype de la progéniture issue du croisement entre un mâle chimérique et une femelle C57BL/6N.

Comme le montre le tableau, les souris agoutis possèdent un fond génétique mixte et ne portent pas la mutation pour *Pq1c2*. Les souris noires possèdent un fond génétique C57BL/6N pur et 50% d'entre elles portent la mutation *Pq1c2*.

La distinction entre les souriceaux agoutis et noirs est évidente (**figure 47**). Par contre, pour les souris noires, un génotypage est nécessaire pour savoir lesquelles portent la mutation.

Sur les 7 mâles chimériques reçus de l'UC Davis, un ne s'est jamais reproduit, trois n'ont donné que des souris agoutis, deux n'ont généré que des souris noires, et un a généré des souris agoutis et des souris noires (**figure 48 et tableau 2**).

		génotype gamètes mâles chimérique			génotype progéniture
		c A P	C a P	C a p	
génotype gamettes femelles C57BL/6N	C a P	c/C A/a P/P	C/C a/a P/P	C/C a/a p/P	
couleur du pelage		agouti	noir	noir	



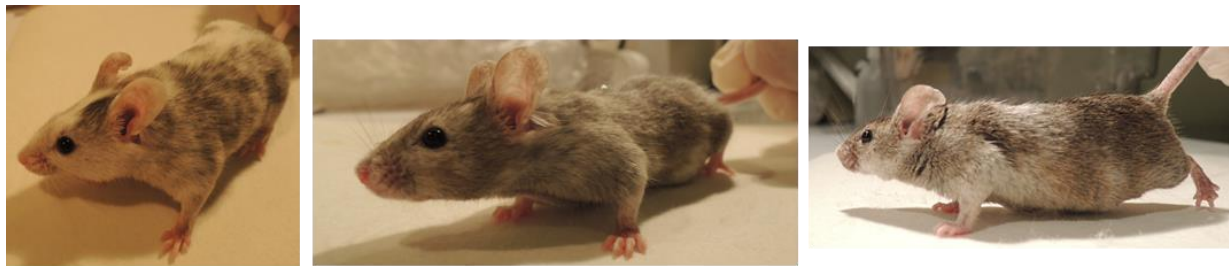
Allèle C : pigmentation possible
Allèle c : Albinos

Allèle A : Agouti
Allèle a : pigmentation homogène

Allèle P : *Pq1c2* sauvage
Allèle p : *Pq1c2^{tm1(KOMP)V1cg}*

Figure 47 : Tableau de croisement entre un mâle chimérique et une femelle C57BL/6N pour la transmission des caractères de couleur de poil et de l'allèle *Pq1c2*.

La photo représente un souriceau de couleur de poil noire (haut) et Agouti (bas) issus d'une même portée.



N°9 50%

N°3 70%

N°19 90%

Figure 48 : Mâles chimériques et couleur du pelage en fonction du taux de chimérisme.

Mâles Chimériques	Clones ES	Pq1c2_AA9		Pq1c2_AH11			Pq1c2_AG9	
	numéro	3	4	7	9	10	19	14
	taux de chimérisme	70%	50%	70%	50%	50%	90%	50%
	Portées observées	0	7	6	3	6	8	6
Souriceaux	TOTAL	0	52	20	28	56	56	48
	Agoutis	0	52	0	28	35/40	0	48
	Noirs, dont :	0	0	20	0	5/40	52	0
	Noirs sauvage	0	0	10/19 (53%)	0	3/5 (60%)	19/52 (37%)	0
	Noirs Htz	0	0	9/19 (47%)	0	2/5 (40%)	33/52 (63%)	0

Tableau 2 : Effectifs des mâles chimériques et descendance associée.

La distinction entre les souris noires sauvages et hétérozygotes (Htz) pour la mutation *Pq1c2^{tm1(KOMP)V1cg}* est déterminée par génotypage.

Fort heureusement, les 3 mâles chimériques ayant fourni des souris noires possèdent la mutation $Pq1c2^{tm1(KOMP)V1cg}$ dans leur lignée germinale puisqu'une fraction de leurs souriceaux noirs (40 à 63%) porte cette mutation sous forme hétérozygote. Notons que ces 3 mâles ont été générés à partir du même clone de cellule ES, justifiant ainsi rétrospectivement l'utilisation de 3 clones au début du projet pour augmenter les chances de succès. Le protocole de génotypage est décrit dans la section suivante.

Une fois les souris hétérozygotes sélectionnées, des accouplements de couple de progéniteurs provenant de fratries différentes ont été réalisés et ont permis d'obtenir des souris homozygotes pour la mutation $Pq1c2^{tm1(KOMP)V1cg}$, appelées souris KO $Pq1c2$ ou souris $Pq1c2^{-/-}$ (**figure 53**). Ce modèle KO est donc viable. Notons qu'il possède déjà un fond génétique pur C57BL/6N.

1.2. Validation de l'inactivation du gène $Pq1c2$

La validation de l'inactivation du gène $Pq1c2$ peut classiquement être réalisée à l'échelle de l'ADN, de l'ARN et de la protéine. Dans cette thèse, les deux premiers niveaux de validation ont pu être effectués. Comme il n'existe pour le moment aucun anticorps exploitable (mon équipe a produit et testé plusieurs anticorps, sans succès), la validation à l'échelle de la protéine n'a pas pu être faite.

Caractérisation de l'allèle muté

Le gène $Pq1c2$ est situé à l'extrémité du bras long du chromosome 4 sur la bande cytogénétique D3 (4qD3 ; 70,63 cM ; base de données Mouse Genome Informatics, assemblage GRCm38). Il s'étend sur environ 17 kb (NCBI Reference Sequence: NC_000070.6, GRCm38.p3 C57BL/6J ,16682 bp, CON 09-FEB-2015).

En principe, la technique Velocigene est conçue pour exciser la totalité des exons codants du gène cible. Cependant, les informations disponibles sur le site du KOMP indiquaient que la délétion de l'allèle $Pq1c2^{tm1(KOMP)V1cg}$ n'était pas complète. D'autre part, les informations disponibles étaient contradictoires, engendrant une incertitude sur la position exacte de la délétion effectuée. Cette information étant capitale pour prédire si l'allèle muté est partiellement ou totalement inactivé, nous avons recharacterisé la position exacte de la délétion.

Afin de déterminer la position et l'amplitude exacte de la délétion du gène $Pq1c2$, nous avons réalisé un séquençage aux deux extrémités du site de délétion prédit pour l'allèle $Pq1c2^{tm1(KOMP)V1cg}$.

Pour l'extrémité 5', nous avons réalisé deux PCR en utilisant une amorce antisens située au début de la cassette et deux amorces sens situées sur le gène à 507 bases d'intervalle l'un de l'autre afin d'encadrer le début de la délétion. Le gel d'agarose obtenu après migration des deux PCR est présenté en **figure 49.A**.

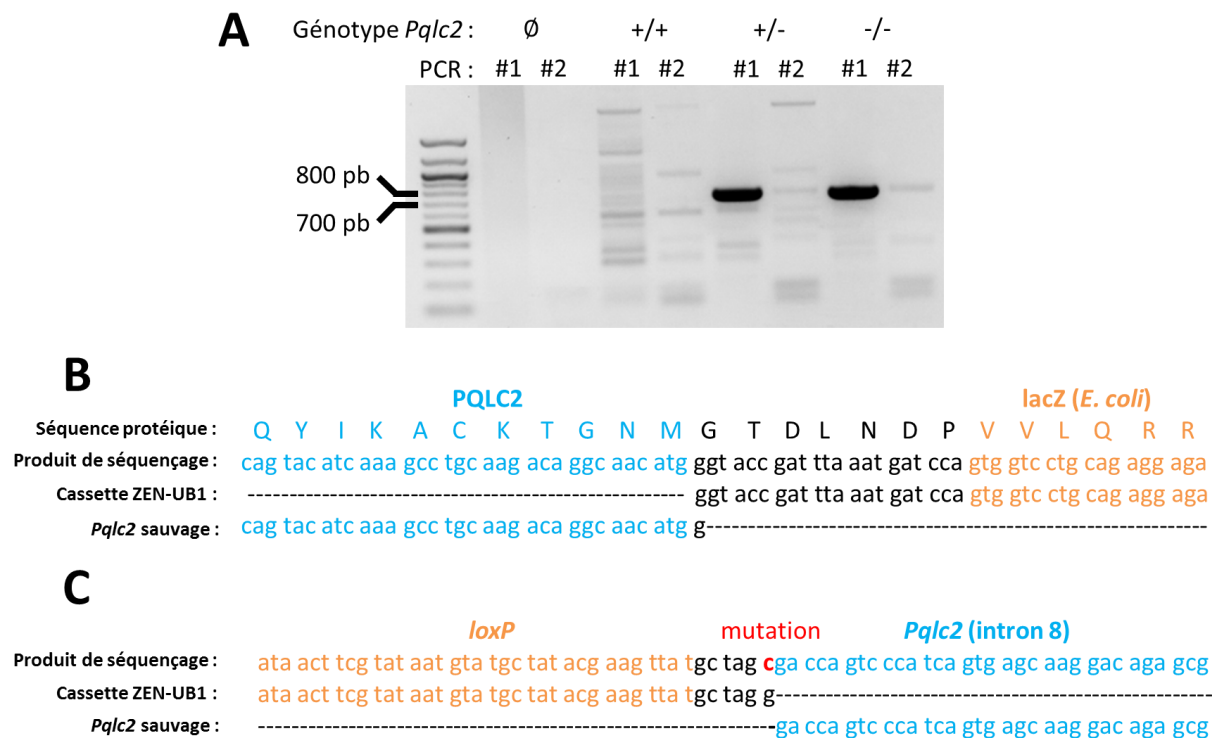


Figure 49 : Détermination de la position d'insertion de la cassette dans le gène *Pqlc2*.

A) Résultats de la migration par électrophorèse sur gel d'agarose des deux produits PCR (#1 et #2) réalisés pour encadrer l'insertion en 5' de la cassette ZEN-UB1 dans le gène *Pqlc2*. **B)** Alignement de la séquence du produit PCR #1 avec la partie 5' de la cassette ZEN-UB1 (noir et orange) et la région correspondante de l'allèle *Pqlc2* sauvage (bleu ; NCBI Reference Sequence : NC_000070.6, GRCh38.p3 C57BL/6J ,16682 bp, CON 09-FEB-2015). **C)** Alignement de la séquence du produit PCR amplifié en 3' du site d'insertion de la cassette avec la partie 3' de la cassette ZEN-UB1 et la région correspondante de l'allèle *Pqlc2* sauvage. Noter en rouge la présence d'une cytosine à la place d'une guanine dans la séquence de la cassette.

La PCR #2 n'a rien donné. La PCR #1 donne un amplicon de taille comprise entre 700 et 800pb. L'insertion de la cassette a donc eu lieu entre le site d'hybridation des deux amorces spécifiques de l'allèle sauvage.

La détermination exacte de la position de la délétion en 5' a été réalisée par séquençage en utilisant des amorces spécifiques de l'amplicon de la PCR #1. Les séquences sont présentés en **figure 49.B**. Après alignement avec le gène *Pqlc2* et la cassette ZEN-UB1, le début de la délétion du gène *Pqlc2* a pu être déterminée. Elle débute ainsi au milieu de l'exon 4, qui correspond à la première boucle cytosolique reliant le TM1 au TM2 (**figure 50.B**).

Pour l'extrémité 3', nous avons utilisé les amorces proposées par le KOMP que nous utilisons pour génotyper les souris. La taille de l'amplicon était attendue aux alentours de 600 pb. La PCR donne effectivement une bande autour de 500-600 pb (**figure 50.C ; set 2'**). Suite à l'analyse des séquences de ces amplicons, et de leur alignement avec le gène *Pqlc2* et la cassette ZEN-UB1, la fin de la

délétion du gène *Pqlc2* a pu être déterminée. Elle se termine ainsi dans l'exon 8, quelques 500 pb avant le début de l'exon 9 (figure 50.A).

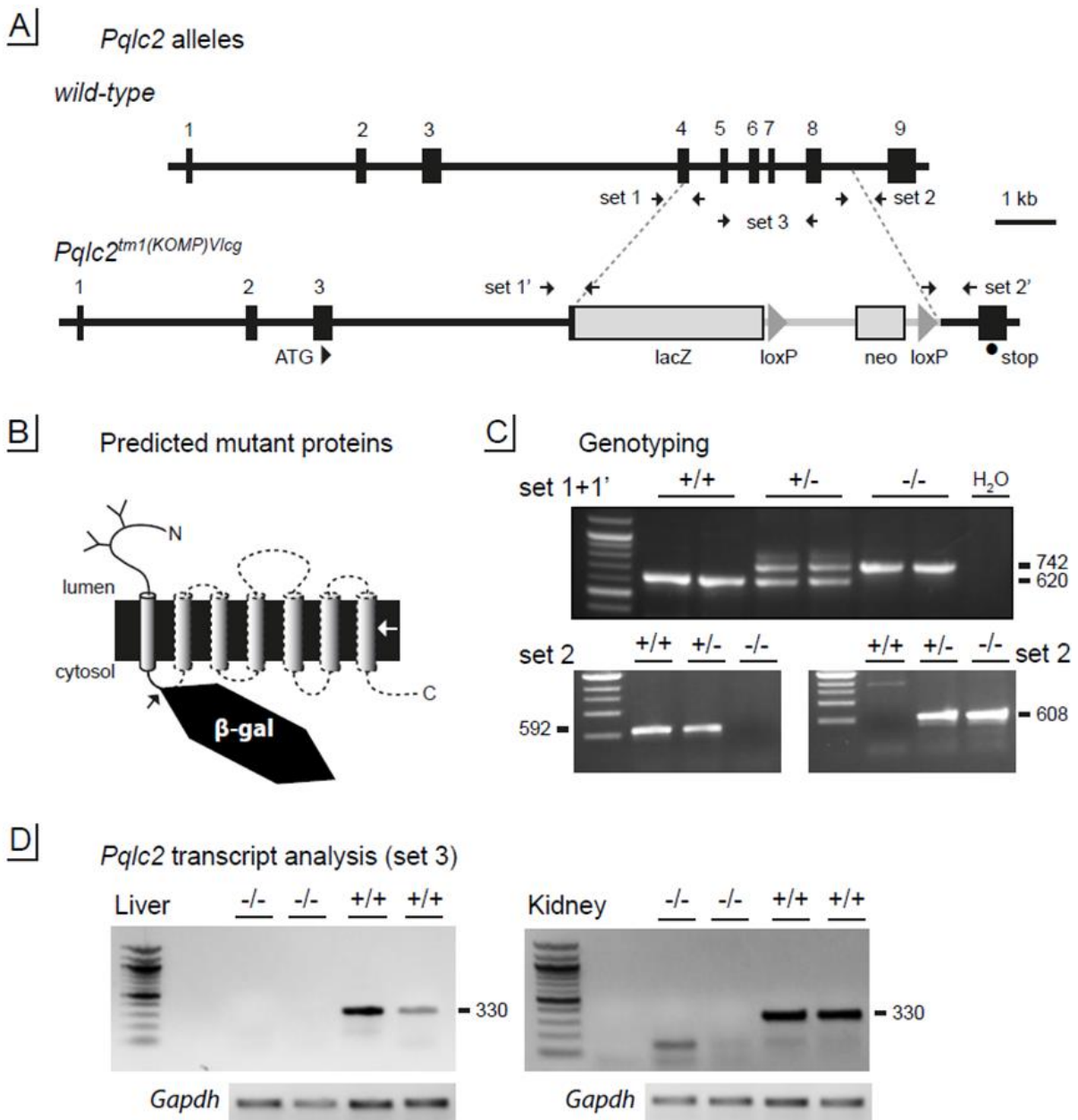


Figure 50 : Validation de l'inactivation du gène *Pqlc2*.

A) Comparaison de l'allèle sauvage *Pqlc2* et de l'allèle muté *Pqlc2^{tm1(KOMP)Vlcg}*. Les sites d'hybridation des différentes amorces utilisées pour analyser la position de l'insertion de la cassette et de la délétion associée sont indiqués. Les informations sur les différentes amorces sont regroupées dans un tableau présenté dans le chapitre « Méthodes ». **B)** Prédiction de la protéine PQLC2 sauvage et de la protéine PQLC2 tronquée fusionnée à la β -galactosidase. **C)** Amplicons obtenus pour paire d'amorces utilisées pour encadrer la délétion. **D)** Amplicons obtenus lors de l'analyse des ARNm *Pqlc2* chez des souris sauvages ou *Pqlc2* KO dans le foie ou le rein.

Pour conclure, le modèle de souris KO pour *Pq1c2* possède une délétion de 2865 pb allant de la position 1137 à la position 4002 du gène *Pq1c2* de référence NC_000070.6, GRCm38.p3. Cette délétion supprime une partie de l'exon 4 et les exons 5, 6, 7 et 8 (**figure 50.A**). La protéine PQLC2 résultante prédite est ainsi amputée de la majorité de sa séquence. Seuls la partie Nterminale, le TM1 et une partie de la première boucle cytosolique subsistent (**figure 50.B**). La délétion de la séquence codante n'est donc pas totale, mais il est peu probable, en supposant que l'ARNm soit stable, que la forme sévèrement tronquée de la protéine ait une quelconque activité.

Une observation issue de l'alignement de ces séquences est qu'il y a présence d'une base C à la fin de la cassette qui ne correspond ni à la séquence de la cassette, ni à *Pq1c2* (**figure 49.C**). Cette base correspond à priori à une mutation G>C de la dernière base de la cassette ZEN-UB1. Elle a pu se produire lors de la recombinaison homologe de la cassette avec le gène *Pq1c2*.

Analyse des transcrits

Ces travaux ont été réalisés par Khady Touré, stagiaire en 2^{ème} année de BTS, sous la supervision de Seana O'Regan et Christine Anne-Longin. Le protocole d'analyse des ARNm est détaillé dans le chapitre « Méthodes ».

L'amplicon attendu pour une PCR utilisant l'ADNc des souris sauvages est d'environ 330 pb. C'est effectivement ce que l'on obtient (**figure 50.D**). En revanche, aucune amplification n'est observée sur les ADNc mutés, confirmant les résultats obtenus sur l'ADN génomique, à savoir la délétion d'une partie du gène *Pq1c2*. Il serait utile d'aller sonder les exons transcrits (la partie codante du gène commence au milieu de l'exon 3) en amont de la zone délétée afin de savoir si l'ARNm muté reste stable et peut induire l'expression de la protéine PQLC2 tronquée.

Conséquence attendue au niveau protéique

Les analyses précédentes ont donc montré que la recombinaison homologe subie par l'allèle muté a induit une délétion allant de l'exon 4 jusqu'à l'avant dernier exon codant. L'impact attendu au niveau protéique est donc une forte troncature de la protéine suivie ou non d'une fusion avec la séquence codante de *lacZ* selon la phase de lecture de l'insertion.

Les résultats déduits du séquençage de la séquence génomique de l'allèle muté sont présentés dans la **figure 51**. La comparaison de cette séquence avec la séquence du PQLC2 sauvage et de la β -galactosidase montre que la protéine codée par l'allèle *Pq1c2*^{tm1(KOMP)VIC} est une protéine de fusion comportant l'extrémité N-terminale (intralysosomale) et la première hélice transmembranaire de PQLC2 suivies de la β -galactosidase privée de ses 9 premiers acides aminés avec intercalation d'un linker.

Cette configuration est très intéressante car elle permettrait de caractériser le profil d'expression de PQLC2 dans divers tissus murins, d'autant plus que la β -galactosidase s'exprime du côté cytosolique.

Par ailleurs, il n'existe à ce jour aucun anticorps spécifique de PQLC2. Le profil d'expression d'un gène donne de précieuses informations sur la fonction possible de la protéine.

Les essais préliminaires de notre partenaire, Bruno Saubaméa, n'ont cependant pas révélé d'activité β -gal dans des tissus supposés exprimer de manière claire PQLC2 chez les animaux sauvages (données transcriptomiques). Nous ne savons pas encore s'il s'agit d'un problème de sensibilité (faible expression du gène sauvage) ou d'un défaut génétique de l'allèle muté.

MVWRTL^{bleu}GASNF^{bleu}STCPNGSVQ^{bleu}WIWDVFG^{bleu}ECAQDGWDEA^{bleu}**VVGLQD^{vert}VSTLCTFA^{vert}STFPQY^{vert}**KACKKTGNMGTDLNDP^{bleu}VVLQRRDWEN^{bleu}PGVTQLNRLAAHPFASWRNSEEARTDRPSQQLRSLNGEWRFAWFPAPEAVPESWLECDLPEADTVVVP^{bleu}SNWQMHGYDAPIYT^{bleu}NVTYPITVNPFFVPTENPTGCYSLTFNVD^{bleu}ESWLQEGQTRIIFDGVNSAFHLWCNGRWWGYGQDSRLPSEFDLSAFLRAGENRL^{bleu}AVMVL^{bleu}RWSDGSYLEDDQMWRMSGIFRDVSL^{bleu}LHKPTTQISDFHVATRFND^{bleu}DFSRVLEAEVQ^{bleu}MCGELRDYLRVTVSLWQGETQV^{bleu}ASGTAPFGGEI^{bleu}IDERGGYADRVTLRLN^{bleu}VENPKLWSAEIPNLYRAVVELHTADGTLIEAEACDVG^{bleu}FREVR^{bleu}IENGLLLLNGKPLL^{bleu}IRGVNRHEHHP^{bleu}LHGQV^{bleu}MD^{bleu}EQTMVQDIL^{bleu}LMKQNNFN^{bleu}AVRCSHYPNHP^{bleu}LWYTLCDRYGLYV^{bleu}DEANIE^{bleu}THGMVPMNRLTDDPRWL^{bleu}PAMSERVTRMVQ^{bleu}DRNHP^{bleu}S^{bleu}VI^{bleu}IWSLGNESGHGANHDALYRWIKSVDPSRPVQYEGGGADTTATDII^{bleu}CPMYARVDE^{bleu}DQ^{bleu}FFAVP^{bleu}KWSIKK^{bleu}WLSLPGETRPLILCEYAHAMGNSLGGFAKYWQAFRQY^{bleu}PRLQGGFVWDWVDQSLIKYDENG^{bleu}NPWSAYGGDFGDT^{bleu}PNDR^{bleu}QFCM^{bleu}NGLVFADRT^{bleu}PHPALTEAKHQ^{bleu}Q^{bleu}FFQ^{bleu}FRLSGQTIEVTSEYLFRHSDNELLHWMVALDGKPLASGEVPLDVAPQ^{bleu}GKQLIEL^{bleu}PELPQ^{bleu}PE^{bleu}SAGQLWLT^{bleu}VRV^{bleu}QPNATAWSEAGHISAWQ^{bleu}WR^{bleu}LAENLSVTLPAASHAIPHLTTSEMDFCIELGNKR^{bleu}WQ^{bleu}FNRQ^{bleu}SGFL^{bleu}SQM^{bleu}WIGDKKQLLTP^{bleu}LRDQ^{bleu}FTRAPLDNDIGVSEATR^{bleu}IDPNAWVERWKAAGHYQAE^{bleu}AALLQCTADTLADAVLITTAHAWQH^{bleu}GK^{bleu}TLFISRKYRIDGSGQMAITVDVEVASDTPHPARIGLNCQLAQVAERVNWLGLGPQENY^{bleu}PDRLTAACFDRWDLPLSDMYTPY^{bleu}VF^{bleu}PSENGLR^{bleu}CGTRELNYGPHQWRGDFQFNISRY^{bleu}SQQQLMETS^{bleu}HRHLLHAE^{bleu}EGT^{bleu}WLNIDGFHMIGGDD^{bleu}SWS^{bleu}PSVSAEFQ^{bleu}LSAGRY^{bleu}HYQLVWCQK [STOP (taataataa)]

Figure 51 : Protéine chimérique codée par l'allèle mutée *Pqlc2*^{tm1(KOMP)Vlc}.

En bleu, partie N-terminale de PQLC2 avec surligné en vert, la position du premier TM1 prédit. En noir, linker reliant PQLC2 à la β -galactosidase. En rouge, β -galactosidase.

1.3. Viabilité et croissances des souris KO *Pqlc2*

Transmission génétique de la mutation

Nous avons réalisé des croisements de couple de souris hétérozygotes pour la mutation et génotypé les souriceaux obtenus. Le **tableau 3** récapitule les effectifs obtenus sur l'ensemble de ma thèse :

généotype	A. effectifs totaux		B. effectif mâle		C. effectif femelle		%mâle	%femelle
	effectifs	%	effectif	% chez les mâles	effectif	% chez les femelles		
+/+	109	0,25	66	0,29	43	0,21	0,61	0,39
+/-	235	0,54	121	0,54	114	0,53	0,51	0,49
-/-	95	0,22	43	0,16	52	0,26	0,45	0,55
total	439		230		209		0,52	0,48
test chi 2 comparant les effectifs obtenus au modèle de transmission mendélien	p=0,17		p = 0,07		p=0,29			

Tableau 3 : Effectifs de souris obtenus par sexe et par génotype pour les croisements de parents hétérozygotes pour *Pqlc2*.

Sur 439 souriceaux obtenus, 25% sont sauvages, 54% sont hétérozygotes et 22% sont KO (homozygotes). Ces effectifs ne diffèrent pas du modèle de transmission génétique mendélien (test χ^2 de conformité, $p = 0,17$ pour les effectifs totaux). *Pq1c2* n'est donc pas un gène vital dans le développement embryonnaire chez la souris de fond génétique C57BL/6N dans nos conditions d'élevage.

Par contre, l'analyse des proportions mâle/femelle montre un effet de l'inactivation du gène *Pq1c2*. En effet, la descendance totale contient 52% de mâle contre 48% de femelle. Ce sex-ratio est comparable à celui trouvé dans la littérature pour des souris C57BL/6 (Verley *et al.*, 1967) (%mâle = 0.52). Cependant, la proportion de mâle est accrue chez les souris sauvages (61%) alors qu'elle est réduite chez les souris KO (45%). La différence des sex-ratio en fonction de ces deux génotypes est significative (test exact de Fisher, $p = 0.033$). Cette différence s'explique par une transmission de la mutation affectée chez les mâles comparée à une transmission mendélienne classique ($p = 0.07$) avec un effectif de mâles KO bas (16%). Ceci n'est pas observé chez les femelles ($p = 0.29$; effectif des femelles KO : 26%).

Pq1c2 pourrait donc agir de manière très ciblée avec un caractère propre aux mâles dans un moment critique du développement embryonnaire durant ou après la différenciation sexuelle.

Croissance et viabilité post-natale

Des courbes de croissance des souris sauvages et KO ont été réalisées afin de détecter d'éventuelles différences chez la souris KO (**figure 52**). Il est en effet possible qu'une altération du recyclage des acides aminés cationiques lysosomaux puisse se répercuter sur le métabolisme et donc sur la croissance des souris porteuses de la mutation. Comme il existe des différences fortes de croissance entre mâle et femelle, la croissance est analysée par sexe. Ces courbes ont été réalisées sur une plage d'âges allant du sevrage (autour du 20^{ème} jour) jusqu'à obtention de la phase plateau de la courbe, soit ici un âge de 120 jours. L'analyse de la croissance à des âges plus précoces est plus délicate car elle nécessite une séparation et un remaniement de la position des souriceaux sous leur mère, ce qui peut altérer l'allaitement.

Il n'y a pas de différences détectables de croissance entre les souris mâles ou femelles sauvages et les souris mâles ou femelles KO (test de Student). Les courbes de poids des souris sauvages sont proches de celles obtenues pour les souris de lignée C57Bl6/NRj du laboratoire JANVIER d'où proviennent les souris femelles utilisées pour la reproduction avec les mâles chimériques (données non présentées).

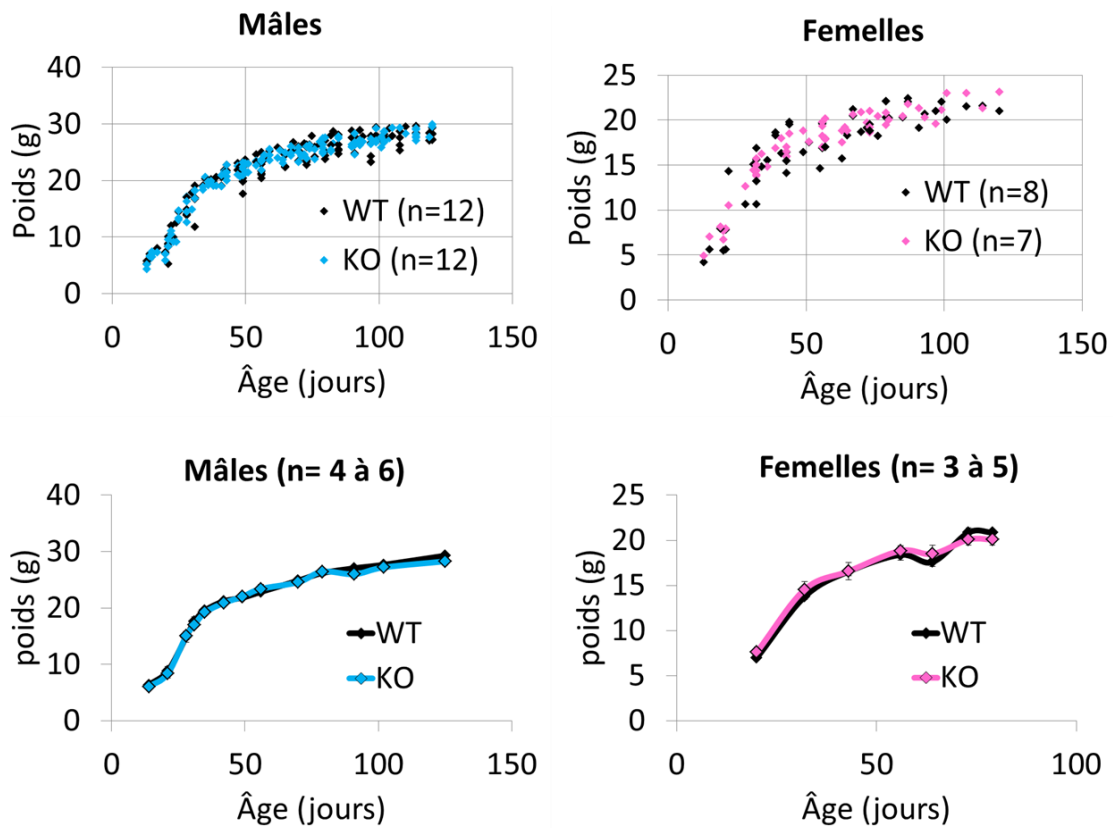


Figure 52 : Courbe de croissance des souris sauvages et KO pour PQLC2.

Haut : Ensemble des mesures de poids réalisées sur les souris mâles (gauche) et femelles (droite) de l'élevage. Chaque point représente une mesure de pesée. Bas : courbes de poids moyennées à +/- 1 jour. Le test statistique de Student a été utilisé pour comparer les poids des souris WT et KO aux différents âges. Il n'y a pas de différences significatives.

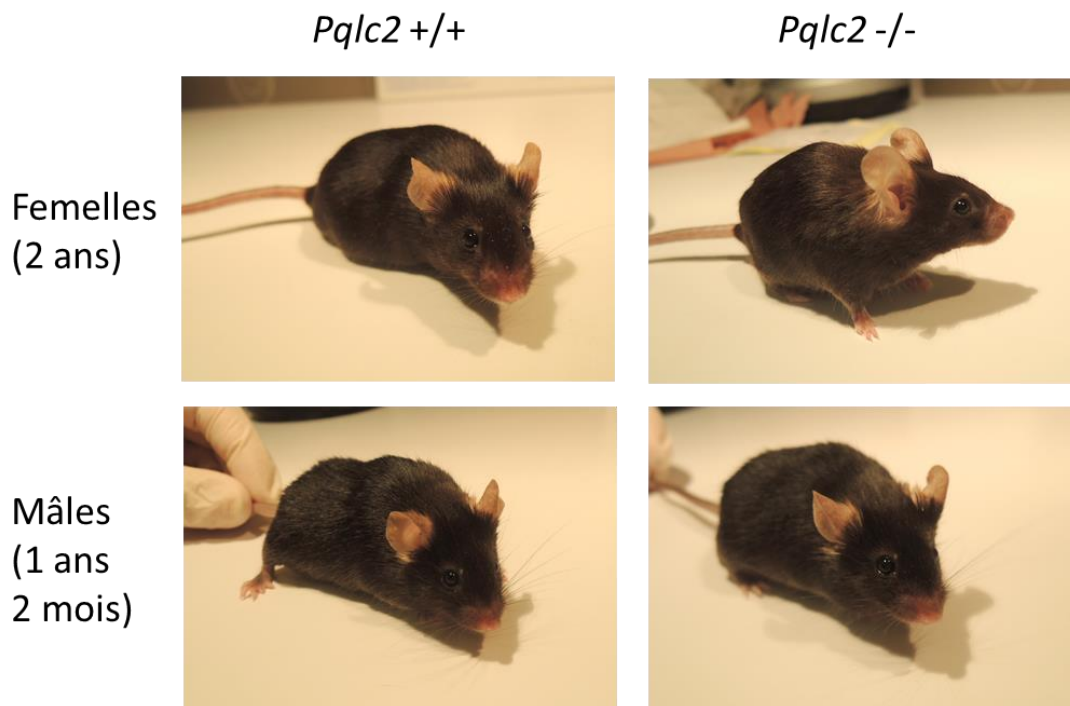


Figure 53 : Les souris KO *Pqlc2* ne présentent pas de phénotype visible à l'œil nu.

La survie des souris KO n'a pas été étudiée selon un protocole dédié à cette question. Sur l'ensemble de la colonie (439 souris étudiées), quelques souris mâles et femelles sont mortes entre 10j et 21j. Quelques souris sont également mortes prématurément après le sevrage et avant d'atteindre l'âge de 1 an. Parmi celles-ci, 1 femelle hétérozygote et 8 mâles majoritairement KO. Pour la plupart de ces mâles, des combats violents liés à des comportements de dominance peuvent expliquer ces morts. Enfin, nous avons pu conserver des souris femelles KO jusqu'à des âges avancés. Toutes ces souris femelles sont mortes, à priori de manière naturelle, à des âges compris entre 22 et 27 mois (660 et 810 jours) (5 femelles KO). Cette espérance de vie apparente est comparable à celle retrouvée dans la littérature concernant les souris C57BL/6 (Goodrick, 1975). De plus, ces souris semblent en bonne santé (**figure 53**).

Pour conclure, la disruption du gène *Pq1c2* ne semble pas affecter la croissance et la survie des souris d'élevage dans le fond génétique C57BL/6N.

1.4. Analyse histologique, cellulaire et subcellulaire

De nombreuses maladies lysosomales se traduisent par des anomalies morphologiques du lysosome, des altérations tissulaires ou des effets sur la taille des organes. Afin d'examiner si des effets similaires se produisent dans nos souris KO *Pq1c2*, nous avons réalisé une collaboration avec le Plateau technique « Imagerie Cellulaire & Moléculaire » de l'Université Paris Descartes dirigé par Bruno Saubaméa. Leurs travaux ont consisté à faire une analyse histologique, cellulaire et subcellulaire de différents organes de ces souris par l'utilisation de préparations histochimiques, de la microscopie optique et de la microscopie électronique à transmission.

Les organes sélectionnés dans le cadre de cette analyse sont le foie, le cerveau, le muscle squelettique et la rate. Ils sont souvent sévèrement atteints dans les maladies lysosomales. Le cervelet a été choisi à titre d'exemple pour l'étude du cerveau.

L'âge des souris utilisées était de 7 à 12 mois. Trois génotypes ont été étudiés : sauvage, KO *Pq1c2* et, à titre de comparaison, le modèle murin de cystinose (KO *Ctns*). Les souris KO *Ctns* nous ont servi de contrôle positif en tant que modèle de maladie lysosomale associée à la perte de fonction d'un transporteur (le gène *Ctns* code pour le transporteur lysosomal de cystine).

Pour cette étude, deux souris de chaque génotype ont été analysées. Les images des tissus de foie, cervelet, muscle squelettique et rate obtenues sur une souris de chaque génotype sont présentées ci-dessous. Ces images sont réalisées à une échelle macroscopique et au niveau de régions clés. Les images obtenues en microscopie électronique de types cellulaires majeurs de ces organes sont également présentées ainsi que l'aspect général et le contenu des lysosomes.

Le foie

Le foie des souris KO *Pq1c2* ne présente aucune anomalie de taille ou d'aspect (**figure 54**). L'espace porte, ainsi que la vascularisation générale des tissus, ne semblent pas altérés. Le parenchyme hépatique est homogène et présente quelques granulomes que l'on retrouve également chez les souris sauvages.

A l'échelle cellulaire, les hépatocytes présentent une morphologie polyédrique classique (**figure 55**). Ils sont reliés entre eux par des jonctions GAP et présentent dans leur cytoplasme de nombreuses gouttelettes lipidiques. Les mitochondries et le réticulum endoplasmique granulaire sont en bon état. A l'échelle ultrastructurale, le contenu en lysosome est riche et varié avec la présence de nombreux autophagosomes. Les cellules immunitaires (cellules de Kupffer, cellules étoilées, lymphocytes) et les cellules endothéliales semblent saines.

Au final, aucune différence nette n'est observable entre le foie des souris sauvages et celui des souris KO *Pq1c2*.

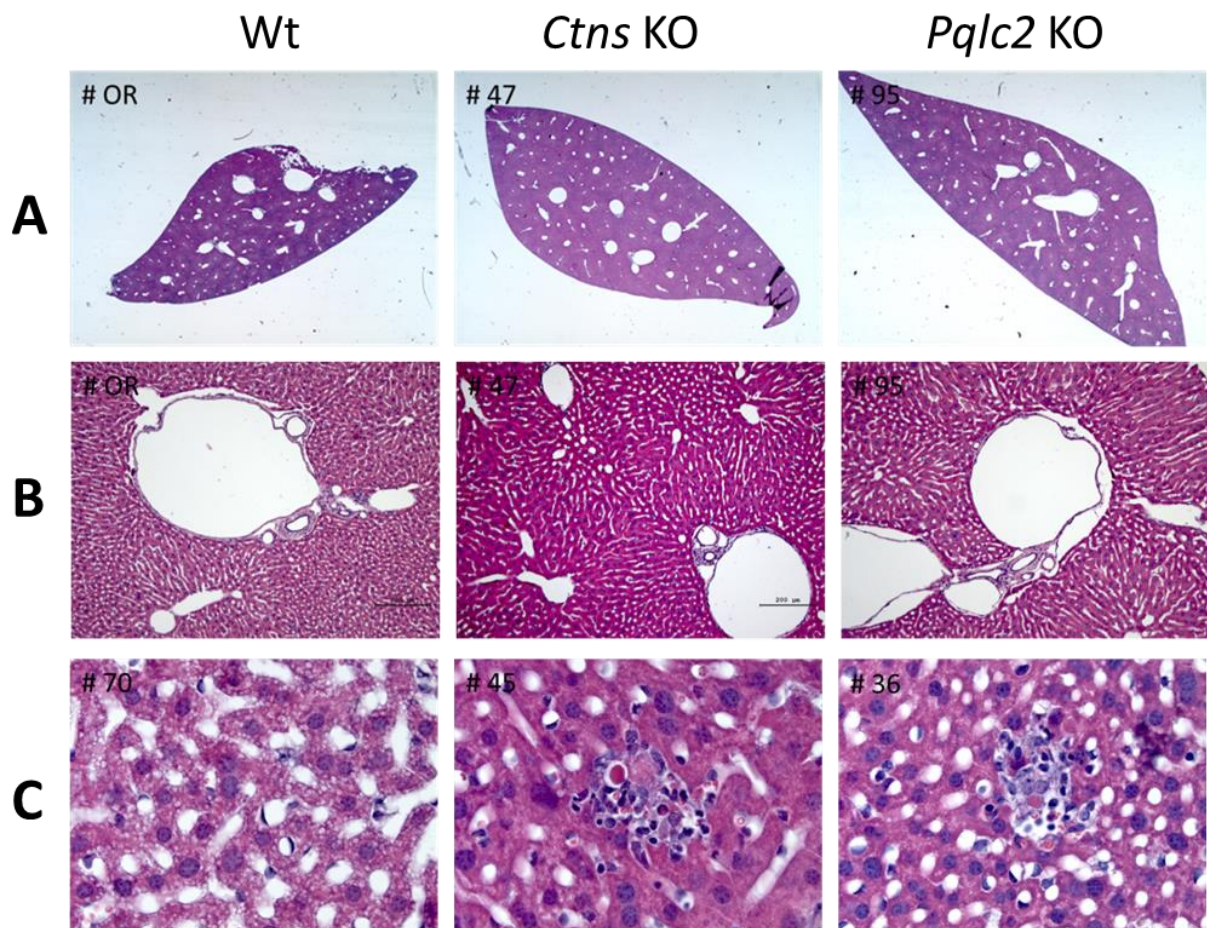


Figure 54 : Coupes histologiques du foie.

A) Coupe entière (X1.25). **B)** Espace porte (X10). **C)** Parenchyme (X63). La légère stéatose observée sur l'image Wt (points blancs) n'est pas spécifique des souris sauvages. La présence de granulomes (points violets) n'est pas spécifique des souris KO.

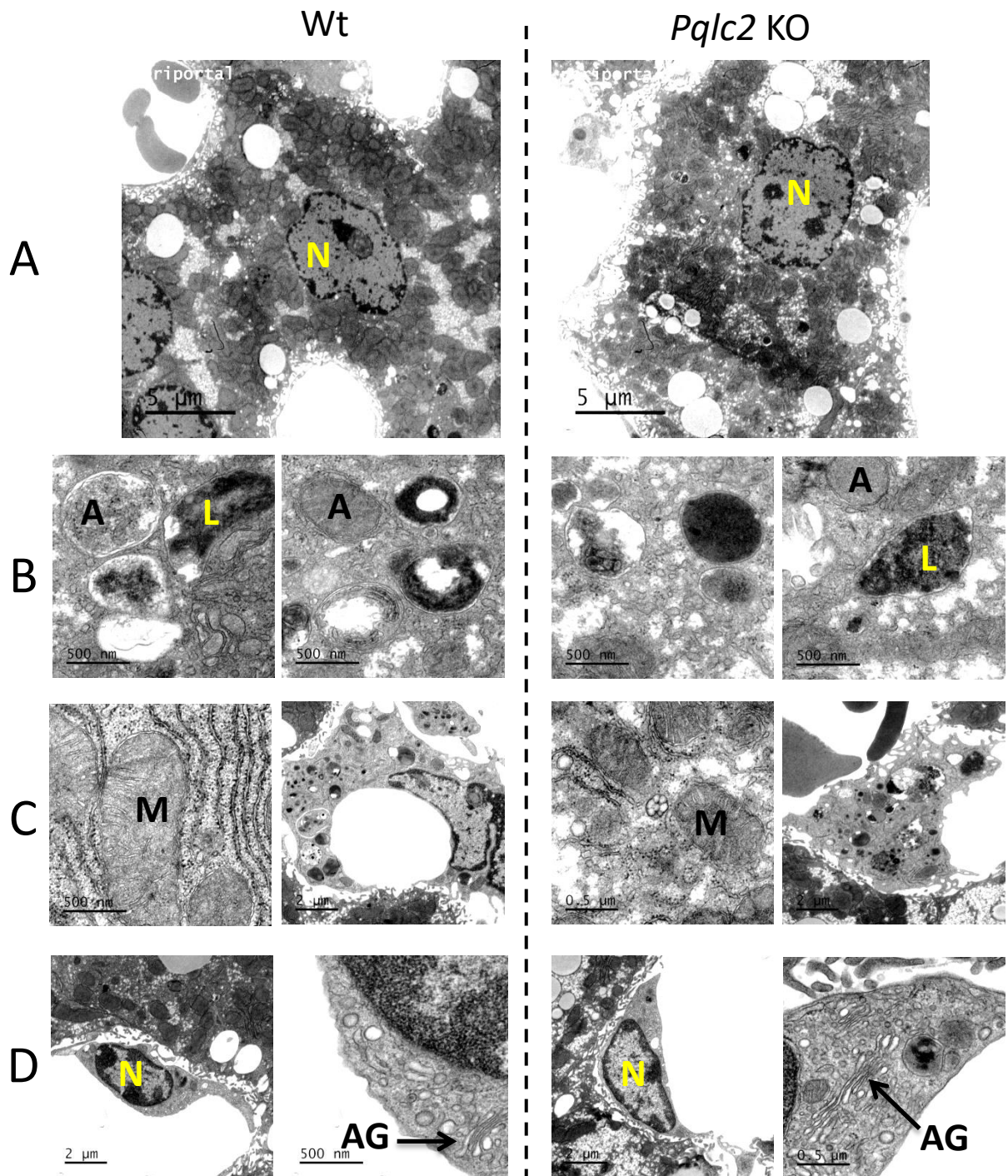


Figure 55 : Analyse par microscopie électronique des types cellulaires majeurs du foie.

N : Noyau cellulaire ; A : Autophagolysosome (double membrane) ; L : Lysosomes (contenu souvent sombre car présence de matériel dense aux électrons) ; M : Mitochondries ; AG : Appareil de golgi.

A) Hépatocytes. **B)** Lysosomes et autophagolysosomes d'hépatocytes. **C)** A gauche pour chaque génotype : Mitochondries et réticulum endoplasmique granuleux (colliers de perles). A droite pour chaque génotype : Cellule de Kupffer. **D)** Cellules endothéliales. L'Appareil de Golgi de ces cellules est facilement identifiable.

La rate

La rate des souris KO *Pq1c2* est compacte et de taille comparable à celle des souris sauvages (**figure 56**). Les zones de pulpe blanche sont bien individualisées vis-à-vis de la pulpe rouge. Chez les souris KO *Ctns*, la pulpe rouge est envahie par la pulpe blanche, signe d'une hématopoïèse accrue. De plus chez ces souris, au sein de la pulpe blanche, on note la présence d'une plus grande quantité de sites d'apoptose. Ces observations qui concernent le modèle KO *Ctns* n'ont pas été décrites dans la littérature. Par contre, à nouveau, la perte du gène *Pq1c2* ne semble pas avoir d'effet majeur à une échelle macroscopique.

La rate est un organe extrêmement actif sur le plan immunologique. On y retrouve de nombreuses cellules du système immunitaire telles que les macrophages, les granulocytes, les neutrophiles et les mégacaryocytes (**figure 57**). Toutes ces cellules sont présentes chez la souris KO *Pq1c2* et ne semblent pas différer de leurs homologues retrouvés dans les souris sauvages. Les macrophages contiennent de très nombreuses inclusions avec des cellules (neutrophiles, plasmocytes, ...) à différents stades de digestion. Leur contenu dans les souris sauvages comme dans les souris KO *Pq1c2* est très hétérogène.

Finalement, aucune différence nette ne ressort de la comparaison entre les souris KO *Pq1c2* et les souris sauvages.

Le muscle squelettique

Concernant le muscle squelettique, le muscle transversal a été pris comme modèle d'étude. A ce jour, seule l'étude histologique a été effectuée (**figure 58**). Sur coupe entière et à grossissement x20, on distingue bien les différentes subdivisions du muscle à savoir les faisceaux et fibres musculaires. L'aspect et l'organisation générale de ce muscle ne semblent pas affectés chez les souris KO *Pq1c2*.

Le cervelet

La cytoarchitecture du cervelet ne présente aucune anomalie (**figure 59**). Les lobules sont bien développés et le cortex semble intact. A plus fort grossissement, la couche des cellules de Purkinje se distingue bien de la couche granulaire et les fibres myélinisées semblent en bon état.

Les images de microscopie électronique vont dans le même sens (**figure 60**). Le corps cellulaire des cellules de Purkinje possède un gros noyau et il est riche en mitochondries et en réticulum endoplasmique granuleux. A l'échelle ultrastructurale, le contenu en lysosome est riche et varié avec la présence notamment de corps multivésiculaires. Les astrocytes sont en bon état tout comme les cellules endothéliales. La myélinisation des axones semble normale et les terminaisons synaptiques sont riches en vésicules synaptiques et en mitochondries.

Aucune différence nette ne ressort de la comparaison entre les souris KO *Pq1c2* et les souris sauvages.

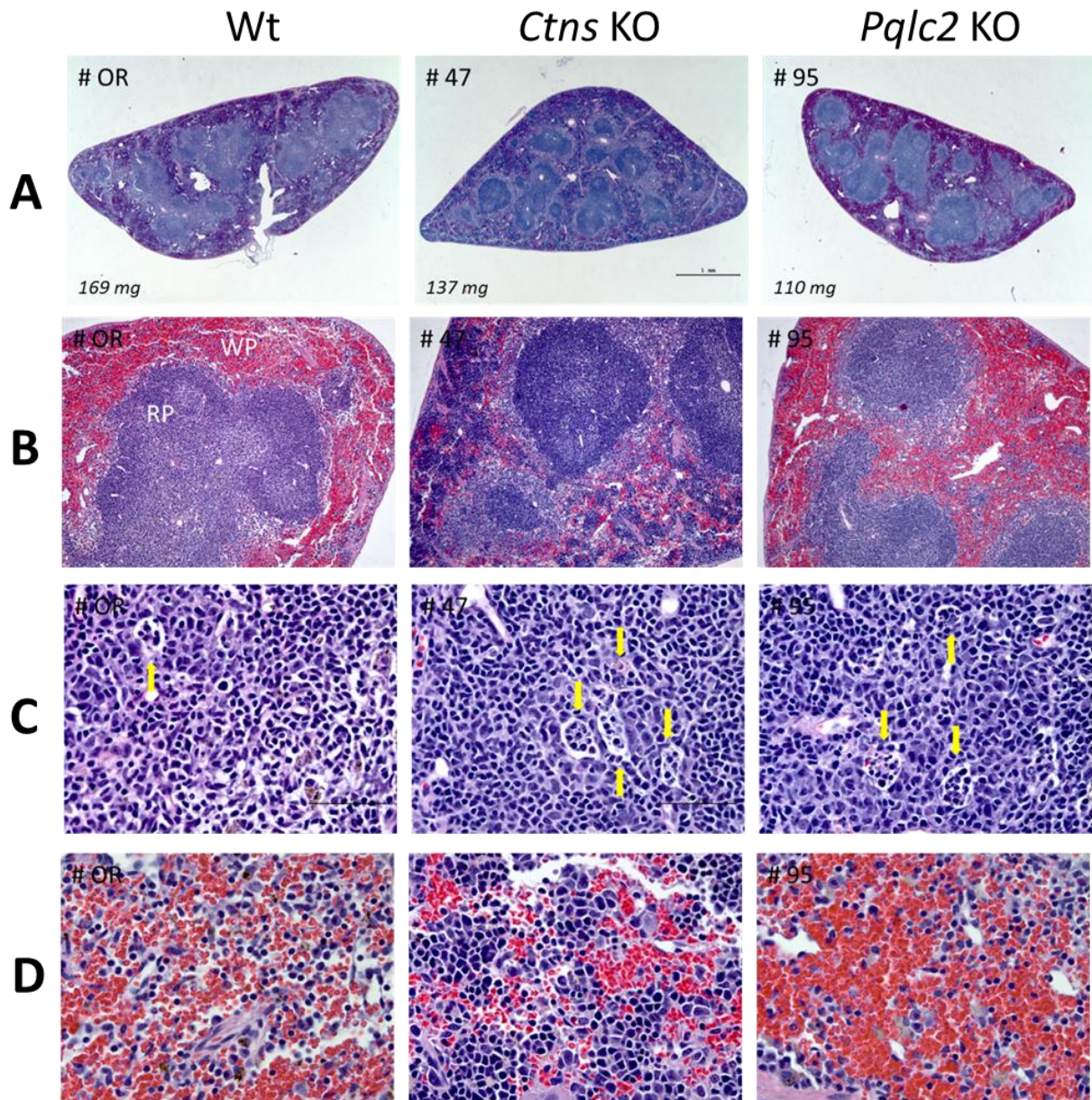


Figure 56 : Coupes histologiques de la rate.

A) Coupe entière (x2.5). **B)** Pulpe rouge (RP) et pulpe blanche (WP) de la rate (x10). Chez les souris *Ctns* KO, la pulpe blanche est envahie par des cellules nucléées (coloration violette). **C)** Centres germinaux (pulpe blanche) ; x63. Apoptose accrue chez les souris *Ctns* KO (disques blancs indiqués par une flèche jaune) et légèrement accentuée chez les souris *Pqlc2* KO. **D)** Pulpe rouge. Hématopoïèse accrue chez les souris *Ctns* KO (x63).

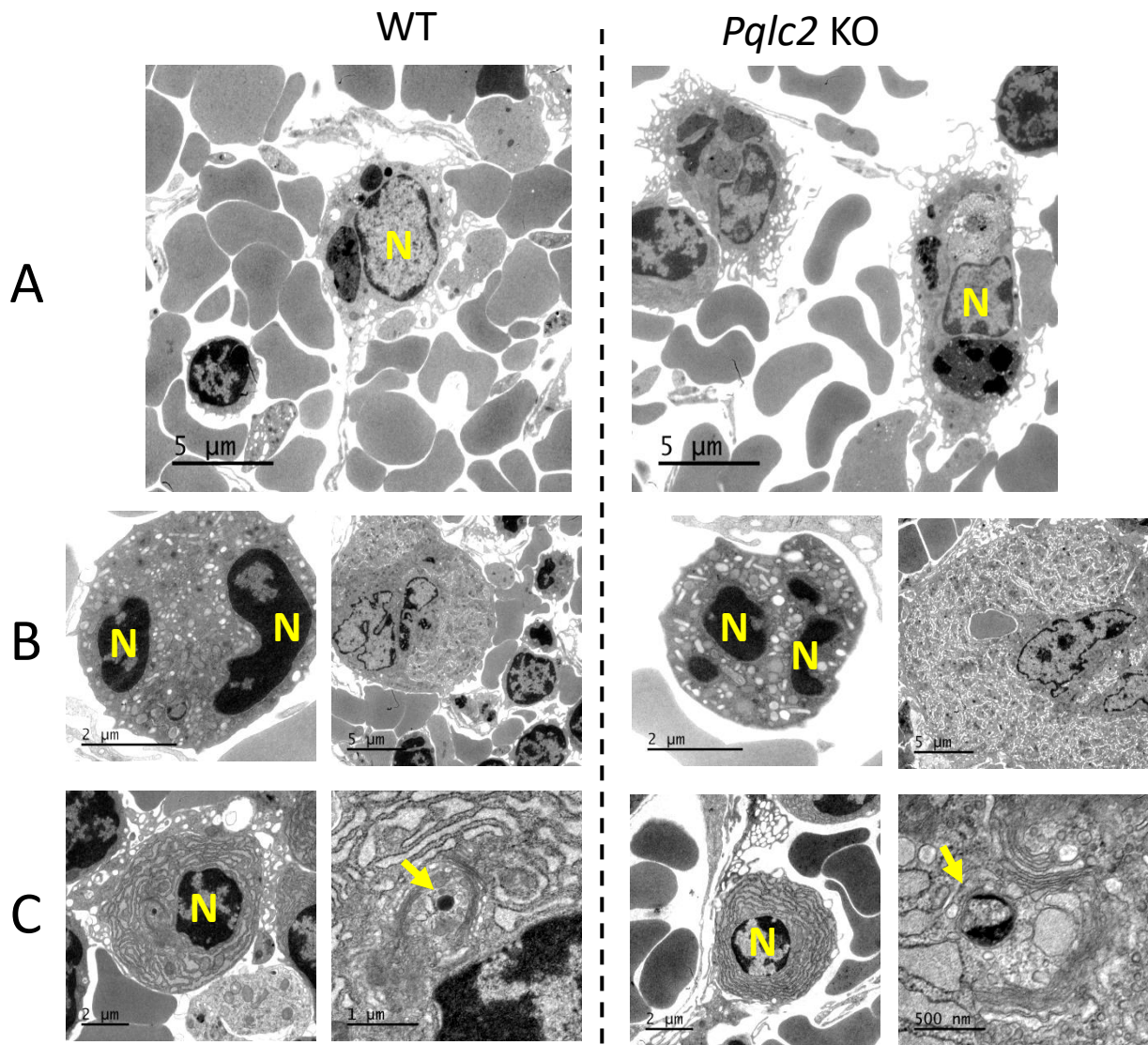


Figure 57 : Analyse par microscopie électronique des types cellulaires majeurs de la rate.

N : noyau cellulaire.

A) Macrophage. **B)** A gauche pour chaque génotype : Granulocyte. A droite pour chaque génotype : Mégacaryocyte. **C)** A gauche pour chaque génotype : Plasmocyte. A droite pour chaque génotype : Ultrastructure des Plasmocytes. La flèche jaune indique la position d'un lysosome (Wt) ou autophagolysosome (*Pqlc2* KO).

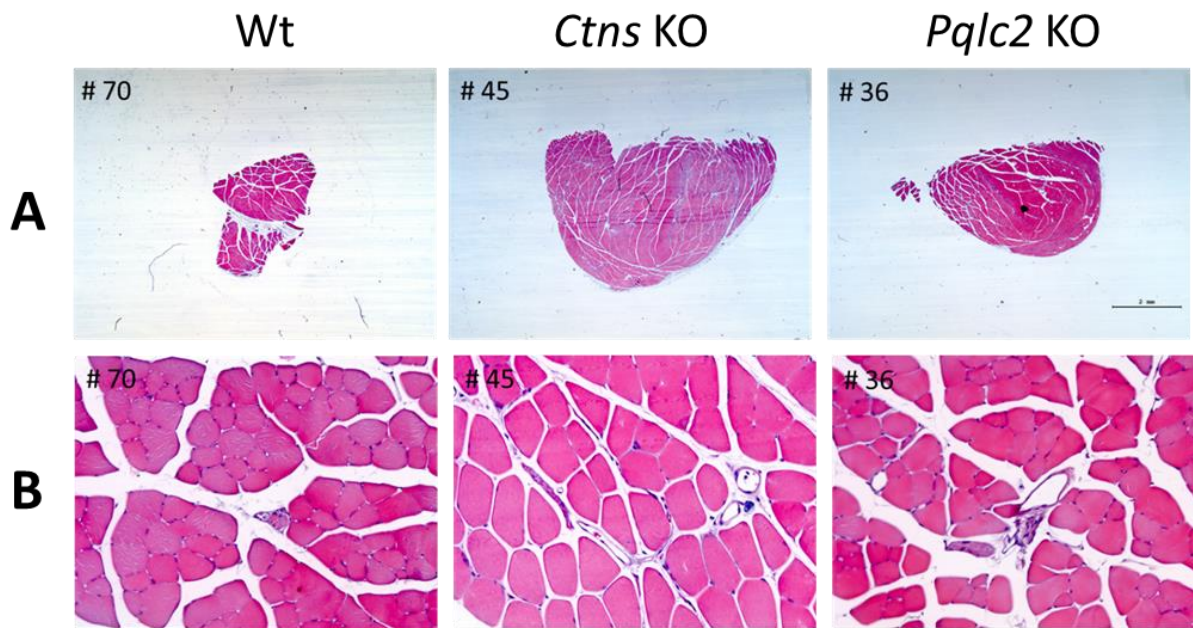


Figure 58 : Coupes histologiques du muscle squelettique.

A) Coupe entière (x1.25). **B)** Faisceaux et fibres musculaires (x20).

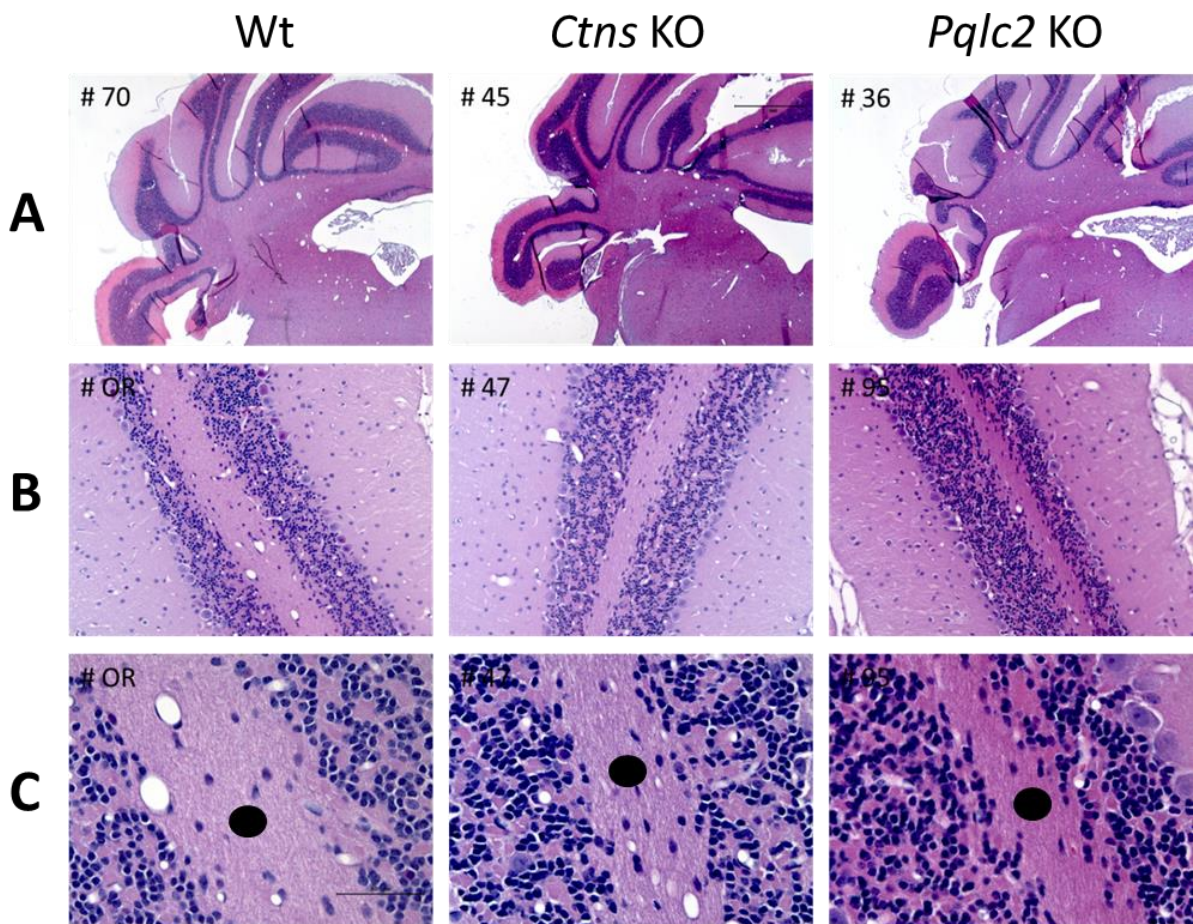


Figure 59 : Coupes histologiques du cervelet.

A) Coupe entière (x2.5). **B)** Cortex (x20). **C)** Fibres myélinisées (indiquées par un point noir) ; x63.

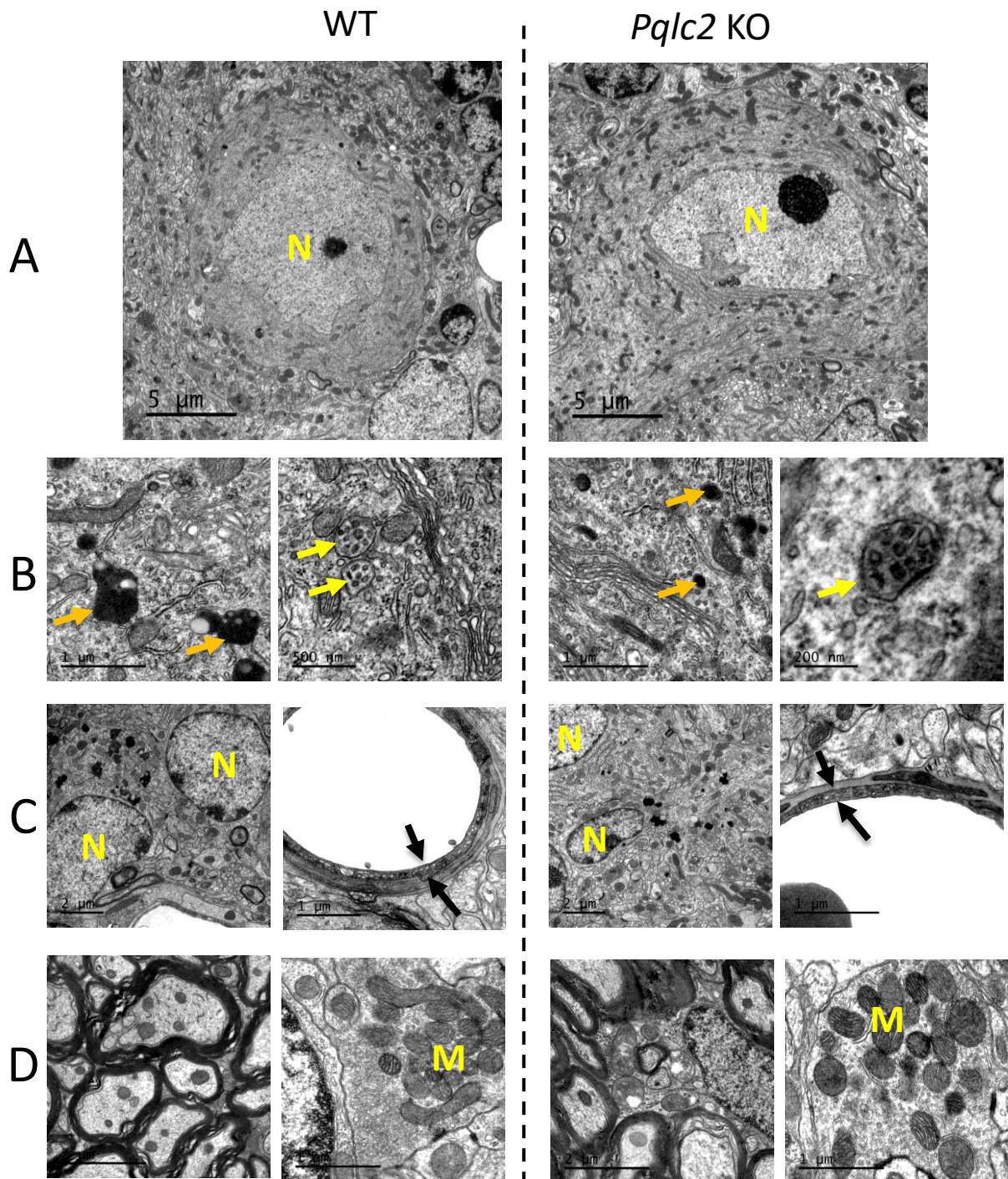


Figure 60 : Analyse par microscopie électronique des types cellulaires majeurs du cervelet.

N : noyau cellulaire ; M : mitochondries.

A) Cellule de Purkinje. **B)** Ultrastructure des cellules de Purkinje. Les flèches oranges indiquent la présence de lysosomes. Les flèches jaunes indiquent la présence de corps multivésiculaires. **C)** A gauche pour chaque génotype : Astrocytes. A droite pour chaque génotype : Vaisseaux. Les flèches noires indiquent la position d'une cellule endothéliale. **D)** A gauche pour chaque génotype : Gains de myéline, apparaissant sous la forme de fibres très noires sur les images, entourant les axones. A droite pour chaque génotype : Terminaison axonale.

Etude préliminaire de la rétine

L'œil, et particulièrement la rétine, est un autre organe souvent atteint dans les maladies lysosomales. Nous avons donc inclus l'étude histologique de la rétine en collaboration avec Marc Abitbol, chercheur au Centre de recherche des Cordeliers - UMRS 1138 de l'Université Paris Descartes.

Les premières coupes histologiques de rétine de souris *Pq1c2* KO ont révélé une anomalie dans l'organisation de la rétine avec la présence de lésions (**figure 61.A**).

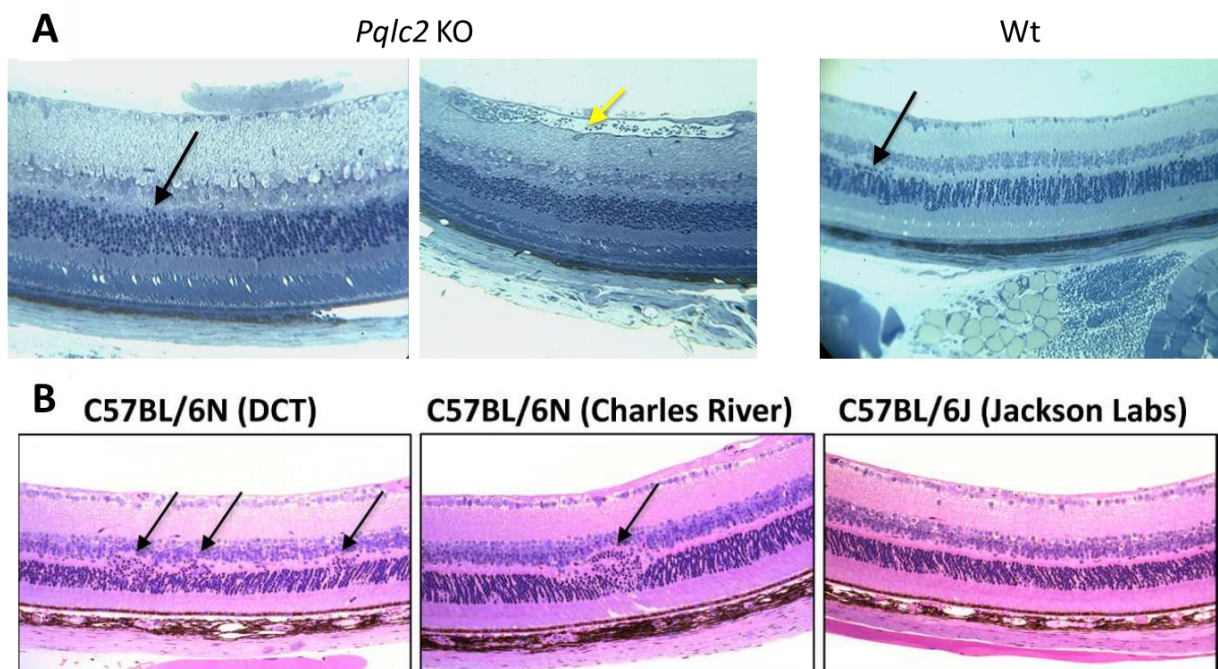


Figure 61 : Coupes histologiques de la rétine.

A) Coupes histologiques de rétines de souris Wt et *Pq1c2* KO. Le fond génétique de ces souris est C57BL/6N. Les flèches noires indiquent la présence d'anomalie dans l'organisation des couches de la rétine. La flèche jaune indique la présence d'un vaisseau de grosse taille dans la rétine d'une souris *Pq1c2* KO. **B)** Figure extraite de l'étude réalisée par Mattapallil et al. (Mattapallil *et al.*, 2012). Coupes histologiques de souris de différents fonds génétiques. Les flèches noires indiquent la présence d'anomalie dans l'organisation de la rétine chez les souris C57BL/6N. Pas d'anomalies observées chez les souris C57BL/6J.

Cependant, le fond génétique C57BL/6N présente une mutation (*Rd8*) dans le gène *Crb1* à l'origine du développement de lésions oculaires (Mattapallil *et al.*, 2012); **figure 61.B**. Ces lésions sont effectivement retrouvées dans les souris sauvages de même fratrie que nos souris KO *Pq1c2* (**figure 61.A**). Il est donc difficile de conclure quant à la présence d'une anomalie de lésions rétinienne dans les souris KO *Pq1c2*. Il faudra réexaminer cette question sur un fond génétique dépourvu de la mutation *Rd8*.

On notera quand même la présence de gros vaisseaux au niveau de la partie externe de la rétine chez les souris KO *Pqlc2* qui est assez inhabituelle chez les souris. Mais encore une fois, il faudrait s'affranchir de l'interférence possible avec *Rd8* pour conclure.

Il sera intéressant de poursuivre l'étude de la rétine car un autre transporteur lysosomal appartenant à une famille de transporteur de CAA, SLC7A14 (un paralogue de CAT1, CAT2, CAT3 et CAT4) est associé à une pathologie rétinienne (Jaenecke *et al.*, 2012; Jin *et al.*, 2014).

Conclusion générale de l'étude histologique

L'analyse morphologique à différentes échelles (tissulaire, cellulaire, ultrastructurale) n'a pas révélé de défaut associé à l'inactivation génétique de PQLC2, hormis peut-être des défauts rétiniens qui nécessitent cependant un plus grand nombre d'animaux et surtout de s'affranchir d'une interférence du fond génétique pour pouvoir conclure de manière claire.

1.5. Etude de l'impact d'un jeûne alimentaire sur le contenu en métabolites du plasma sanguin

En l'absence de défauts morphologiques visibles, nous avons cherché à établir des défauts fonctionnels induits par l'inactivation génétique de PQLC2.

PQLC2 représente une source de CAA pour le cytosol en assurant leur export de la lumière lysosomale. Il doit donc être nécessaire pour mobiliser les CAA libérés par la protéolyse de composants cellulaires lors du processus d'autophagie.

L'autophagie peut-être basale (pour la maintenance cellulaire) ou induite. Par exemple, l'autophagie est stimulée par une carence en acides aminés pour permettre l'homéostasie des acides aminés du cytosol. Dans ces conditions induites, le rôle attendu de PQLC2 dans le réapprovisionnement du cytosol par les CAA issus des lysosomes doit être exacerbé. La perte de PQLC2 devrait donc perturber l'homéostasie des CAA intracellulaires.

A l'échelle de l'organisme, à la suite d'un jeûne, cette perturbation doit se traduire par une accumulation de CAA dans les tissus. Ils seront en effet piégés dans les lysosomes et ne seront donc pas métabolisés. De plus, cette perturbation doit, au contraire, induire une baisse prononcée des CAA plasmatiques. En effet, l'autophagie induite se fait de manière plus prononcée dans certains tissus (muscle, foie) pour produire des acides aminés, qui sont ensuite redistribués par la circulation sanguine vers d'autres organes, comme par exemple le cerveau.

Dans un premier temps, nous avons décidé de doser les acides aminés plasmatiques en réponse à un jeûne.

Ce choix était renforcé par la description d'un défaut sélectif d'homéostasie des CAA plasmatiques, mais pas des autres acides aminés, lorsque des souris déficientes pour les deux isoformes des canaux TPC du lysosome sont soumises à un jeûne (Cang *et al.*, 2013). Ces canaux contrôlant le potentiel de membrane du lysosome, cet effet sélectif pourrait s'expliquer par la forte dépendance au potentiel de l'activité de transport de PQLC2 (voir chapitre 1).

Résultats

Le protocole utilisé est adapté de l'étude de Ezaki J, et al. (Ezaki *et al.*, 2011); voir chapitre « Méthodes ».

Les échantillons plasmatiques de deux groupes de 4 souris mâles WT et KO *Pqlc2* pré-jeûne et après 24h de jeûne ont été analysés par GC/MS-TOF par Françoise Gilard à la plateforme Métabolisme Métabolome de l'IFR87. L'analyse métabolique du plasma a identifié 105 métabolites dont 66 ont été sélectionnés pour l'analyse. Une analyse statistique a été effectuée pour comparer l'effet du jeûne et celui de la perte du gène *Pqlc2* sur les 66 métabolites plasmatiques testés (WT, KO, avant jeûne (a), pendant jeûne (p)). Un des échantillons contenant le plasma d'une souris KO avant jeûne (KOa) n'a pas pu être analysé.

La perte de poids des souris sur l'ensemble du protocole est comprise entre 11 % et 18 % (**tableau 4**). Cette perte est comparable entre les groupes de souris KO et WT (13 % +/- 1.0 contre 14 % +/- 1.5 respectivement ; n = 4 pour chaque groupe de souris ; p=1, test de Student).

		poids j0 8h00			poids j0 10h00		poids j+1 10h00		
		poids j-1 8h00 (g)	poids (g)	% perte vs j-1	poids (g)	% prise de poids vs -2h	poids (g)	% perte vs j-1	moyenne % perte
Wt	♂ 76	35,7	32,9	8	34	3	31,5	12	14
	♂ 80	35,7	32	10	32,6	2	29,9	16	
	♂ 84	35,8	32,7	9	32,9	1	31	13	
	♂ 94	40,4	37,5	7	37	-1	35,2	13	
KO	♂ 81	34,2	29,9	13	30,7	3	28,2	18	13
	♂ 83	40,6	36,8	9	37,3	1	35,5	13	
	♂ 92	38,6	35,5	8	35,6	0	34,4	11	
	♂ 93	36,2	33,3	8	33,6	1	31,9	12	

Tableau 4 : Etude de la perte de poids liée au protocole de prélèvement sanguin et de mise à jeûn.

Il n'y a pas de différences significatives observées entre la perte de poids des souris WT et KO (test de Student).

L'analyse en composante principale, qui permet de mettre en évidence, sans à priori, des différences entre des groupes d'échantillons, est enthousiasmante car elle génère 4 nuages de points correspondant aux 4 conditions testées (**figure 62**).

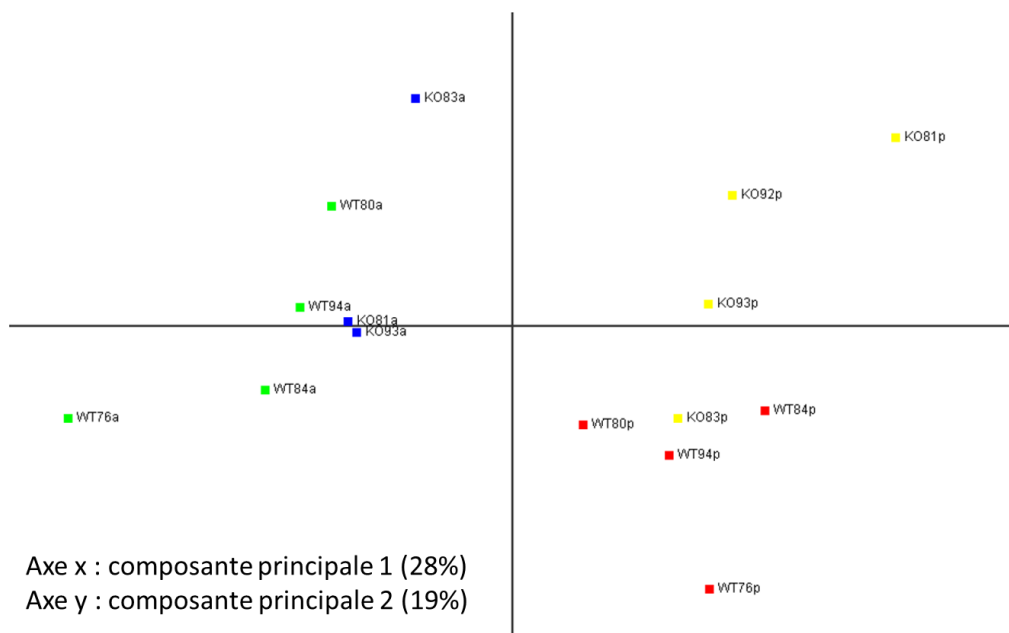


Figure 62 : résultats de l'analyse en composante principale.

Vert et rouge : échantillons plasmatiques de souris sauvages avant (a) et pendant (p) le jeûne, respectivement. Bleu et jaune : échantillons plasmatiques de souris KO *Pq1c2* avant (a) et pendant (p) le jeûne, respectivement. Les chiffres intercalés dans les noms donnés aux points correspondent aux numéros des souris. Les composantes principales 1 et 2 représentent à eux deux 47% de la dispersion totale des valeurs.

Effet du jeûne				Effet du génotype				Effet du génotype sur le jeûne	
Wta vs WTp		Koa vs Kop		Wta vs Koa		Wtp vs Kop			
métabolite	p value	métabolite	p value	métabolite	p value	métabolite	p value	métabolite	p value
Pinitol	0,00289	Pinitol	0,00175	Oleic ac	0,04232	Malic ac	0,02430	alpha-cétoglu	0,0515
Glucose 1	0,00608	Glucose	0,00267			Fumaric ac	0,03762	Fumaric ac	0,0951
Glucaric I	0,00764	Glucaric I	0,01177			Myo-inositol	0,03795		
Urea	0,02218	Urea	0,01243						
Gulcopyr	0,01157	Palmitic ac	0,04081						
Tagatose 1	0,01206								
2,4bis OH-But	0,00895								
Decanoic ac	0,00903								
Palmitoleic	0,02800								
Octanoic ac	0,00009								
Benzoic ac	0,00148								
Stearic ac	0,00256								
Glycerol 3P	0,01575								
Thr	0,02780								
Met	0,04363								
Pro	0,04564								

Tableau 5 : Analyse de l'effet du jeûne, du génotype et de l'effet du génotype sur le jeûne.

Rose : le taux plasmatique du métabolite baisse avec le jeûne. Vert : le taux plasmatique du métabolite augmente avec le jeûne. (a) avant le jeûne. (p) à 24h de jeûne. Analyse statistique : un test de Student est utilisé pour analyser l'effet du jeûne ou du génotype (par paire pour l'analyse du jeûne). Un test Anova à deux facteurs est utilisé pour analyser l'effet du génotype sur le jeûne.

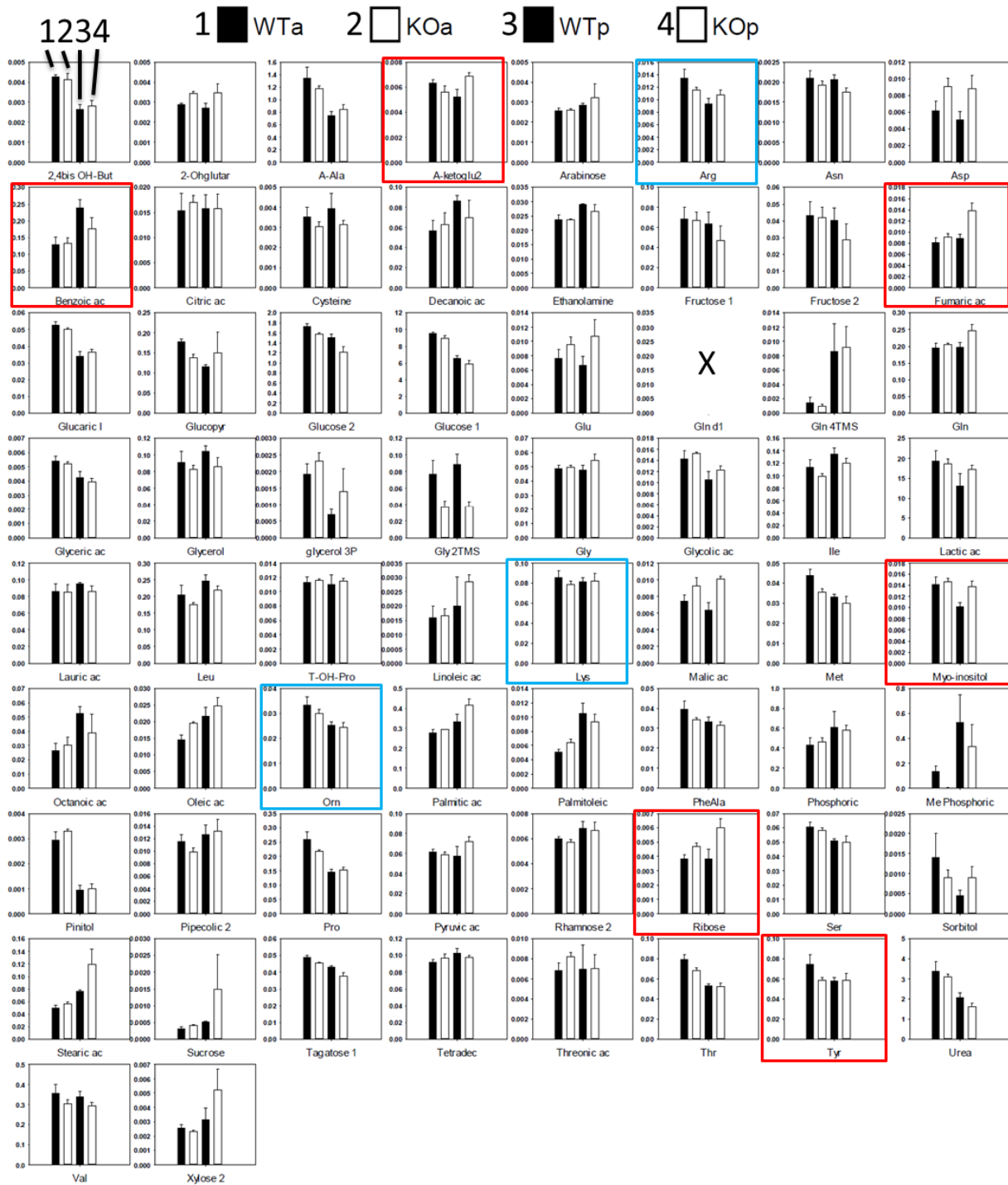


Figure 63 : histogrammes des moyennes des valeurs de chaque métabolite analysé pour chaque condition.

Les valeurs mesurées correspondent aux aires des pics mesurées pour chaque métabolite identifié, rapportées à l'aire de l'étalon interne. (a) avant le jeûne. (p) à 24h de jeûne. Cadres bleus : acides aminés cationiques (Arg ; Lys, Orn). Cadres rouges : Métabolites pour lesquelles l'inactivation de *Pqlc2* semble avoir un effet sur leurs taux plasmatiques suite au jeûne.

Les résultats obtenus sur l'ensemble des 66 métabolites analysés sont présentés sous la forme d'histogrammes des moyennes obtenus pour chaque condition (**figure 63**). La Gln d1 n'a pas pu être vérifiée, les valeurs de Gln sont plus fiables. Les taux plasmatiques des métabolites qui sont significativement influencés par le jeûne, le génotype ou de l'effet du génotype sur le jeûne sont présentées dans le **tableau 5**.

Le protocole de jeûne fait globalement baisser le taux plasmatique des sucres, des acides aminés et de l'urée, et fait monter le taux plasmatique des acides gras (**figure 63 et tableau 5**). Cette dernière réponse semble logique car, pendant le jeûne, les souris puisent leur énergie dans l'utilisation des graisses.

Concernant les acides aminés, chez les souris sauvages, cette baisse n'est en réalité significative que pour quelques acides aminés : la thréonine, la méthionine et la proline (**tableau 5** ; test de Student par paire). Le jeûne n'induit pas de baisse significative d'Arg ($p=0.17$; $n=4$) ou de Lys ($p=0.17$, $p=0.7$, respectivement ; $n=4$) (**figure 63, cadres bleus**). C'est également le cas pour les souris KO ($p=0.35$, $p=0.75$, respectivement ; $n=3$). Ces résultats sont assez similaires de ceux observés sur les acides aminés dans l'étude de Ezaki J, et al. (Ezaki *et al.*, 2011). En effet, après une période de 24h de jeûne chez des souris sauvages, sur 18 acides aminés mesurés, ils observent une baisse importante du taux en alanine, thréonine, méthionine, proline et asparagine (**figure 65**). Donc 3 acides aminés sur 5 sont communs avec nos observations. Comme dans notre étude, les taux plasmatiques d'arginine et de lysine évoluent peu.

Finalement, l'inactivation de *Pq1c2* semble avoir quelques effets sur la réponse au jeûne (**figure 63, cadres rouges**). Cependant, ces différences disparaissent lorsque l'on regarde l'évolution du taux de ces métabolites pour chaque souris (**figure 64**). Aucune différence significative n'est ainsi observée sur l'ensemble des métabolites étudiés (**tableau 5**, test Anova à deux facteurs).

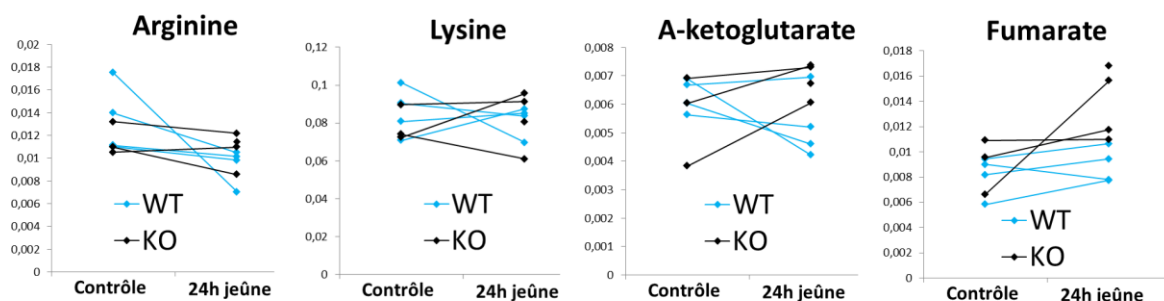


Figure 64 : Comparaison de l'évolution individuelle du taux plasmatiques de l'arginine, la lysine, de l'A-ketoglutarate et du fumarate suite au jeûne chez les souris WT et KO pour *Pq1c2*.

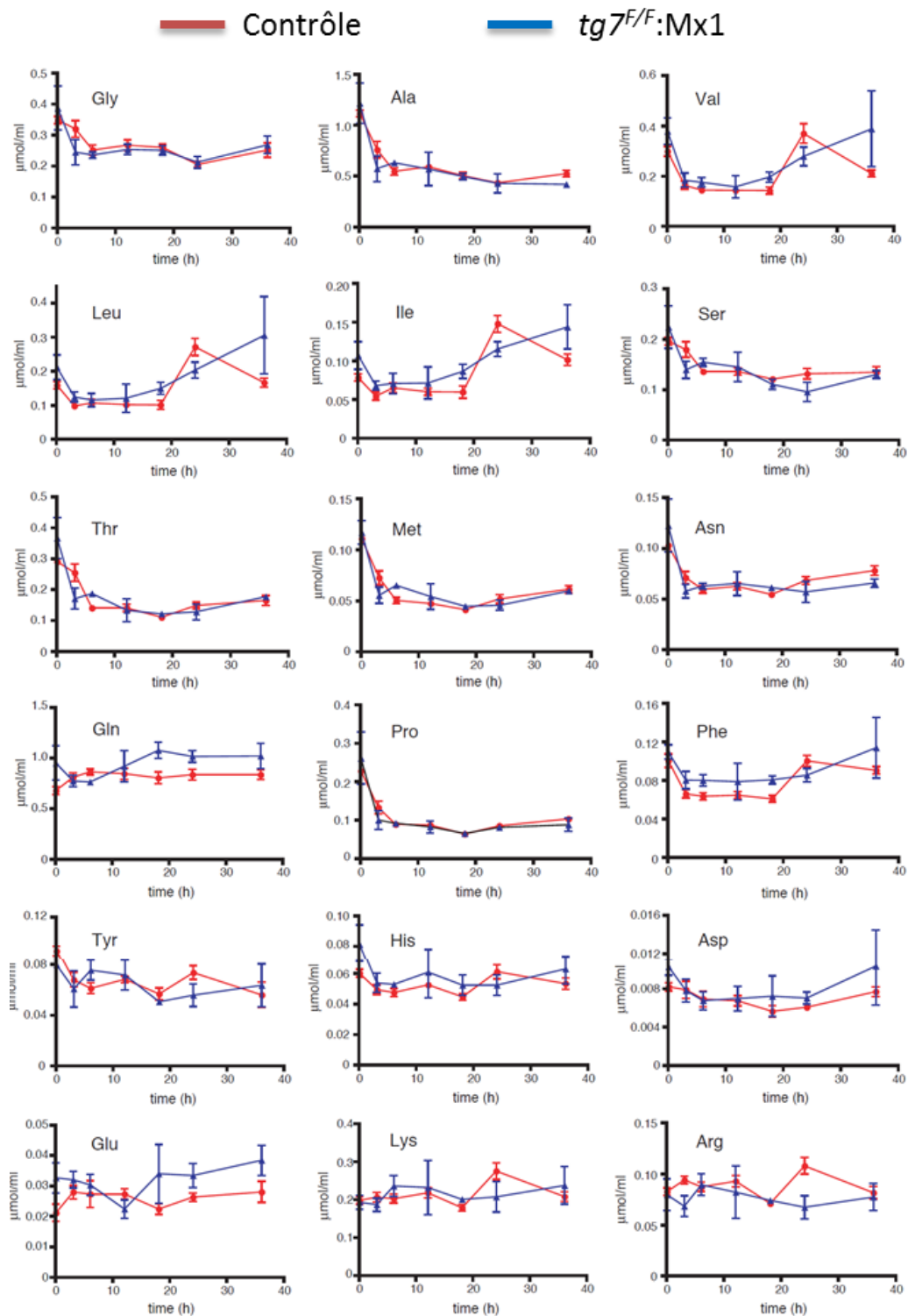


Figure 65 : Résultats de l'étude réalisée par Ezaki et al. sur l'évolution du taux plasmatique des acides aminés au cours du jeûne chez la souris (Ezaki *et al.*, 2011).

Les mesures sont effectuées avant (t=0) et à différents temps d'un jeûne de 36 h réalisé chez des souris sauvages (rouge, Contrôle) et chez des souris dont l'autophagie est spécifiquement bloquée dans le foie (bleu, $tg7^{F/F}:Mx1$).

La conclusion de cette étude est que le plasma n'est pas le bon tissu pour répondre à la question posée, c'est-à-dire le rôle de PQLC2 dans la mobilisation des réserves intracellulaires en CAA. C'est d'autant plus vrai que l'inactivation sélective de l'autophagie dans le foie (**figure 65, souris tg7^{F/F}:Mx1**) analysé dans l'étude de Ezaki et al., a globalement peu d'effet sur l'évolution du taux plasmatique en acides aminés. Il faudra donc se focaliser sur les CAA tissulaires dans le cadre de l'autophagie basale (sans jeûne), ou induite (avec jeûne) en s'intéressant particulièrement aux muscles et au foie qui sont des organes actifs dans le catabolisme des protéines pour la production d'énergie lors de périodes de carence (Mizushima *et al.*, 2004; Ezaki *et al.*, 2011).

Il faudra également réaliser ce type d'expérience avec un nombre plus élevé d'animaux. La perte d'un échantillon pour les souris KO faisant passer le nombre d'échantillons à 3, il est difficile de réaliser des analyses statistiques et donc d'observer des tendances nettes.

2. Mise en évidence d'une interaction génétique entre PQLC2 et la cystinosine

2.1. Motivation de ces travaux

Actuellement, le meilleur traitement médical contre la cystinose est l'utilisation de la cystéamine (www.cystinosisresearch.org). Ce médicament réagit avec la cystine accumulée dans la lumière du lysosome des patients cystinotiques et génère un disulfure mixte cystéine-cystéamine reconnu et exporté hors du lysosome par PQLC2 (Jézégou *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2012). Malgré la généralisation de ce traitement chez les patients cystinotiques depuis 1994, l'identification de PQLC2 est trop récente pour que l'on sache s'il est requis dans tous les aspects du traitement par la cystéamine, notamment s'il intervient dans tous les organes.

La construction du modèle KO pour *Pqlc2* et le fait que cette inactivation n'induit pas d'effet majeur offrent la possibilité d'obtenir des réponses à ces questions. En effet, nous avons à notre disposition le modèle murin de la cystinose développé par l'équipe de Corinne Antignac en 2002 (Cherqui *et al.*, 2002). Cette lignée, sur un fond génétique C57BL/6J, est KO pour le gène de la cystinosine (*Ctns*). Cette lignée est viable et fertile. Il est donc en principe possible, en croisant les deux lignées, d'obtenir un modèle murin double KO pour *Ctns* et *Pqlc2* sur fond génétique C57BL/6 (précisément, il s'agira d'un fond mixte C57BL/6J-C57BL/6N). Ainsi, en comparant l'effet de la cystéamine sur des souris KO *Ctns* et sur des souris double KO *Pqlc2-Ctns* (PC), le rôle de PQLC2 dans l'effet thérapeutique de la cystéamine peut être étudié dans chaque organe.

2.2. Stratégie de génotypage

Le génotypage de *Pqlc2* utilise les amorces définies pour l'analyse du simple KO *Pqlc2* (**figure 50**). Le génotypage de *Ctns* utilise les amorces et conditions déterminées dans l'article de l'étude de Cherqui S *et al.* (Cherqui *et al.*, 2002). Trois amorces sont utilisées afin d'amplifier l'allèle sauvage et/ou l'allèle muté. Un exemple de résultat de génotypage est présenté en **figure 66**. L'amplicon amplifié par PCR de l'allèle sauvage possède une taille de 1085pb, celui de l'allèle muté possède une taille de 700pb.

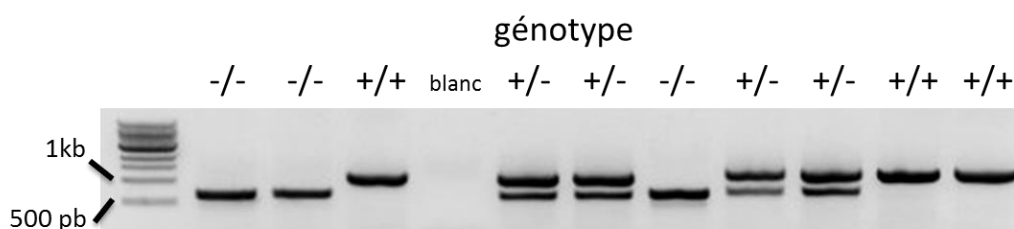


Figure 66 : gel d'électrophorèse suite à l'amplification par PCR de l'allèle sauvage (bande haute) ou mutée (basse) de *Ctns*.

2.3. Essai de production du double KO *Pqlc2-Ctns* et analyse génotypique des croisements

Le premier croisement entre un mâle KO *Ctns* et une femelle KO *Pqlc2* a permis de générer des souris hétérozygotes pour ces deux gènes (*Pqlc2 +/- Ctns +/-*). Ces souris ont été croisées entre elles afin d'obtenir des souris double KO *Pqlc2-Ctns* (simplement appelées par la suite « double KO »). Le **tableau 5** récapitule les effectifs obtenus pour ce type de croisement sur l'ensemble de ma thèse.

genotype	Observé		Modèles de transmission génétique des allèles <i>Pqlc2</i> et <i>Ctns</i>			
	effectif	%	Mendélien	léthalité embryonnaire ou périnatale du double KO	léthalité gamétique double KO (spermatozoïde OU ovule)	léthalité gamétique double KO (spermatozoïde ET ovule)
P+/+C+/+	12	5	6	7	8	11
P+/+C+/-	32	12	13	13	17	22
P+/+C-/-	11	4	6	7	8	11
P+/-C+/+	46	17	13	13	17	22
P+/-C+/-	98	37	25	27	25	22
P+/-C-/-	18	7	13	13	8	0
P-/-C+/+	22	8	6	7	8	11
P-/-C+/-	26	10	13	13	8	0
P-/-C-/-	0	0	6	0	0	0
total	265	100	100	100	100	100
		test chi2	p<1E-06	p=1.7E-04	p=1.9E-04	p<1E-06

Tableau 6 : Effectifs de souris obtenus par génotype pour les croisements de parents double hétérozygotes *Pqlc2-Ctns*.

Le cadre rouge met en évidence l'effectif nul des souris de génotype double KO *Pqlc2-Ctns*.

Le génotype double KO est associé à une léthalité synthétique prénatale ou périnatale

De manière inattendue, aucun double KO n'a été observé dans la descendance. Il existe donc une léthalité synthétique associée à l'inactivation de ces deux gènes. Or, les lignées KO *Pqlc2* ou KO *Ctns* sont viables et fertiles (Cherqui *et al.*, 2002; Nevo *et al.*, 2010) (voir la section sur le modèle murin KO *Pqlc2*). C'est donc l'interaction génétique entre les deux transporteurs lysosomiaux qui est létale.

Afin d'analyser cette interaction, nous avons comparé les effectifs observés avec différents modèles de transmission génétique : Mendélien ; avec létalité synthétique embryonnaire ou périnatale ; avec létalité de l'une ou l'autre gamète haploïde de génotype double KO ; et avec létalité gamétique des deux gamètes de génotype double KO (**tableau 6**).

Le modèle Mendélien est stochastique, il considère que la probabilité de transmission de chaque allèle est identique. On peut donc estimer une probabilité d'apparition pour chaque génotype, exprimée en pourcentage. Ces pourcentages permettent de générer des effectifs théoriques que l'on peut comparer à l'aide d'un test statistique du chi-2 aux effectifs réellement observés. La probabilité que la transmission génétique des allèles suive le modèle proposé peut ainsi être testée.

Ces pourcentages sont présentés dans le **tableau 6** dans la colonne du modèle Mendélien. Au vu du nombre de souris obtenues, nous aurions dû voir naître 16 souris avec le génotype double KO (6 % de 265) ou au moins 12 approximativement, si l'on considère l'effectif de souris sauvages, qui ont la même probabilité mendélienne. Le modèle de transmission mendélien est rejeté par le test statistique du chi-2 ($p < 1E-06$). La létalité est donc hautement significative.

Le génotypage des souris est réalisé sur des souris ayant atteint un âge minimal de 6 jours. La double mutation est donc létale à un stade prénatal ou périnatal (chez les souris, indépendamment du génotype, la mortalité postnatale des premiers jours est fréquente ; c'est le cas dans notre élevage). Nous avons cherché à préciser ce stade en confrontant les résultats des croisements à plusieurs modèles de létalité synthétique.

L'hypothèse de létalité embryonnaire ou périnatale des doubles KO est simple à modéliser. Il suffit de considérer que la probabilité d'observer un génotype double KO est nulle et de calculer les nouvelles probabilités d'apparition de tous les autres génotypes. Ces probabilités, exprimées sous la forme de pourcentages, sont présentées dans le **tableau 6** dans la colonne dédiée à ce modèle. Un test statistique du chi2 est à nouveau utilisé afin de comparer les effectifs théoriques du modèle aux effectifs observés. Même si les effectifs des génotypes proposés par ce modèle semblent plus proche des effectifs observés que ceux proposés par le modèle de transmission Mendélien, il est à nouveau rejeté ($p = 1.7E-4$).

Si la présence des deux mutations est létale au stade haploïde, chez les gamètes mâles ET/OU femelles, alors il sera impossible d'obtenir des souris double KO. Nous avons donc également testé ces deux hypothèses (#1 : ET ; #2 : OU). Les proportions des effectifs de génotype obtenus suivant ces deux modèles sont présentés dans le **tableau 6** dans les deux dernières colonnes. Ces deux modèles sont clairement rejetés par le test chi-2 ($p < 2E-4$ et $p < 10E-6$, respectivement).

Ainsi, tous ces modèles « simples » ne permettent pas d'expliquer les effectifs des génotypes issus de ces croisements de souris doubles hétérozygotes. Il a donc fallu envisager d'autres pistes plus complexes.

Analyse de l'interaction génétique de PQLC2 et de la cystinosine en fonction du sexe

La létalité synthétique prénatale pourrait être dépendante du sexe. En effet, la transmission de l'allèle mutée de *Pqlc2* est altérée chez les mâles (voir la section sur le modèle murin KO *Pqlc2*). Nous avons donc comparé les effectifs des différents génotypes obtenus pour chaque sexe (**tableau 7**).

génotype	effectifs	
	mâle	femelle
P+/ <i>+</i> C+/ <i>+</i>	5	4
P+/ <i>+</i> C+/ <i>-</i>	18	13
P+/ <i>+</i> C-/ <i>-</i>	6	4
P+/ <i>-</i> C+/ <i>+</i>	21	21
P+/ <i>-</i> C+/ <i>-</i>	44	54
P+/ <i>-</i> C-/ <i>-</i>	7	5
P-/ <i>-</i> C+/ <i>+</i>	12	8
P-/ <i>-</i> C+/ <i>-</i>	16	12
P-/ <i>-</i> C-/ <i>-</i>	0	0
total	129	121
test chi2	p=0,8036	

Tableau 7 : Effectifs de souris obtenus par génotype et par sexe pour les croisements de parents double hétérozygotes *Pqlc2-Ctns*.

Cependant, il n'y a pas de différences observées entre les effectifs des génotypes mâles et femelles ($p=0,8$; test chi2 d'homogénéité). L'interaction génétique de PQLC2 et de la cystinosine n'est donc pas liée au sexe.

Il existe un « effet dosage » du nombre d'allèles mutés

Une procédure pour analyser plus globalement la transmission génétique de ces deux allèles mutés est de normaliser les effectifs observés par rapport aux effectifs théoriques Mendéliens (**figure 67.A**). L'analyse de ces résultats reste complexe. Cependant, on peut, à titre provisoire, voir dans cette complexité deux phénomènes :

1) Un déficit d'effectif de tous les animaux *Pqlc2* +/*+*. Comme les fonds génétiques des deux lignées parentales étaient légèrement différents (C57BL/6N et C57BL/6J pour *Pqlc2* et *Ctns*, respectivement), cela pourrait être dû à l'existence d'un SNP (Single-Nucleotide Polymorphism) ou d'autres variations voisines du gène *Pqlc2* entre les deux fonds génétiques (Simon *et al.*, 2013). Ces variations pourraient affecter, par exemple, le développement ou la survie embryonnaire.

2) Un effet de dosage de gènes conduisant à la létalité synthétique qui peut être totale ou partielle selon le nombre d'allèles mutés. Ce « dosage » comporte aussi un effet de seuil : il en faut un nombre minimum de trois pour que la létalité s'exprime (**figure 67.B et C**). Ce déficit d'effectif dans les génotypes comportant 3 allèles mutés est manifeste, par exemple, lorsque l'on compare les animaux *Pqlc2* +/- *Ctns* -/*-* (7% de l'effectif total), avec ceux de génotype *Pqlc2* +/- *Ctns* +/*+* (17%) qui

auraient dû apparaître avec la même fréquence. De la même manière, le génotype *Pqlc2* *-/- Ctns* *+/-* (10%) a quasiment la même fréquence que le génotype *Pqlc2* *-/- Ctns* *+/+* (8%) alors qu'il aurait dû être deux fois plus abondant.

Quoi qu'il en soit, à ce stade, on peut clairement affirmer qu'il existe une interaction génétique entre PQLC2 et la cystinosine (épistasie) qui aboutit à une létalité synthétique totalement pénétrante quand le double KO est complet. Le stade à laquelle elle intervient reste à déterminer (gamétique, embryonnaire, périnatal). De plus, cette létalité synthétique semble sensible à un effet de dosage du nombre d'allèles mutés, avec une létalité synthétique partielle chez les souris porteuses de 3 allèles mutés.

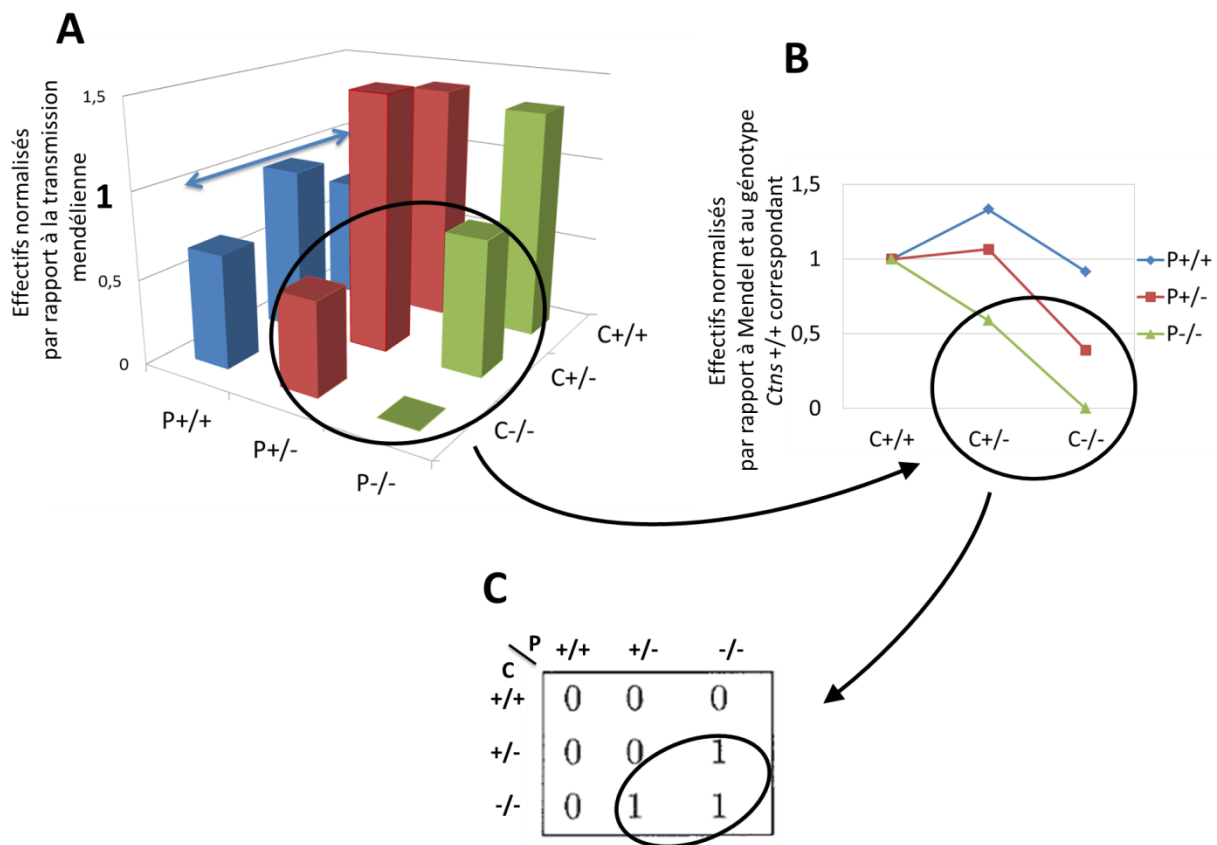


Figure 67 : Analyse de la distribution des génotypes issus des croisements d'animaux doublement hétérozygotes *Pqlc2-Ctns*.

A) Normalisation des effectifs observés par rapport au modèle de transmission Mendélien. Une valeur de 1 signifie que l'effectif observé est identique à l'effectif Mendélien. La flèche bleue met en évidence le défaut d'effectif des génotypes sauvages pour *Pqlc2* (*P*+/+). Le cercle noir indique un défaut d'effectif des génotypes présentant au moins 3 allèles mutés. **B)** La normalisation des effectifs observés par rapport à Mendel et à leur équivalent *Ctns* sauvage (*+/+*) fait apparaître un effet de « dosage » du nombre d'allèle mutés : un défaut de 50% de l'effectif attendu apparaît à partir de 3 allèles mutés. Ce défaut atteint 100% si les 4 allèles sont mutés. **C)** Ce modèle de transmission se rapproche d'un modèle théorique d'épistasie entre deux locus avec effet de seuil (d'après Li and Reich, 2000).

2.4. Confirmation du phénotype de létalité synthétique

Compte tenu de la complexité des résultats des croisements d'animaux doublement hétérozygotes, et pour diminuer le nombre de croisements nécessaires, nous avons cherché à confirmer l'interaction entre les gènes *Pqlc2* et *Ctns* en effectuant des croisements simplifiés entre deux partenaires possédant 3 allèles mutés (3-mut pour simplifier).

Il y a 4 croisements de souris 3-mut possibles. Nous appellerons croisements « symétriques » ceux où le mâle et la femelle possèdent le même génotype. Les croisements « asymétriques » sont ceux où le mâle possède un seul allèle muté pour le gène retrouvé KO chez la femelle, et la femelle un seul allèle muté pour le gène retrouvé KO chez le mâle. Il existe ainsi deux possibilités : les croisements où le mâle est KO pour le gène *Pqlc2* et hétérozygote pour *Ctns* tandis que la femelle est KO pour *Ctns* et hétérozygote pour *Pqlc2*, et la situation réciproque.

Croisements asymétriques

Les résultats des deux possibilités de croisements asymétriques sont présentés dans les **tableaux 8** et **9**. Les effectifs des génotypes issus de ces deux croisements doivent être identiques si l'interaction des deux mutations est sans effet (voir la colonne du modèle Mendélien dans ces deux tableaux).

Mâle P-/- C+/- x Femelle P+/- C -/-			Modèles de transmission génétique des allèles <i>Pqlc2</i> et <i>Ctns</i>			
	Observés		Mendélien	létalité embryonnaire ou périnatale du double KO	létalité spermatozoïde double KO	létalité ovule double KO
genotype	effectif	%	%	%	%	%
P+/- C+/-	29	57	25	33	50	50
P+/- C-/-	6	12	25	33	0	50
P-/- C+/-	16	31	25	33	50	0
P-/- C-/-	0	0	25	0	0	0
total	51	100	100	100	100	100
		test chi2	p<1E-06	p=6.6E-04	p<1E-06	p<1E-06

Tableau 8 : Effectifs de souris obtenus par génotype pour les croisements asymétriques Mâle *Pqlc2* -/- *Ctns* +/- x Femelle *Pqlc2* +/- *Ctns* -/-

Concernant le croisement « Mâle *Pqlc2* -/- *Ctns* +/- x Femelle *Pqlc2* +/- *Ctns* -/ » (**tableau 8**), à nouveau, aucun double KO n'est observé. De plus, les effectifs des génotypes 3-mut sont réduits comparé à celui du génotype doublement hétérozygote. Cet effet est plus prononcé pour le génotype *Pqlc2* +/- *Ctns* -/ , ce qui était déjà le cas dans le croisement précédent.

Ces croisements confirment donc les observations faites dans le croisement antérieur : la létalité synthétique est totalement pénétrante pour les doubles KO et partielle chez les animaux 3-mut. Les différents modèles de transmission génétique préalablement testés sont à nouveau tous rejetés, mais cela reflète simplement le fait que nous n'avons pas considéré l'effet de dosage de gènes dans les modèles testés.

Mâle P+/- C-/- x Femelle P-/- C +/-			Modèles de transmission génétique des allèles Pqlc2 et Ctns			
genotype	Observés		Mendélien	létalité embryonnaire ou périnatale du double KO	létalité spermatozoïde double KO	létalité ovule double KO
	effectif	%	%	%	%	%
P+/- C+/-	9	35	25	33	50	50
P+/- C-/-	5	19	25	33	50	0
P-/- C+/-	12	46	25	33	0	50
P-/- C-/-	0	0	25	0	0	0
total	26	100	100	100	100	100
		test chi2	p=6E-03	p=0.24	p<1E-06	p<1E-06

Tableau 9 : Effectifs de souris obtenus par génotype pour les croisements asymétriques Mâle *Pqlc2* +/- *Ctns* -/- x Femelle *Pqlc2* -/- *Ctns* +/-

Les résultats du croisement « Mâle *Pqlc2* +/- *Ctns* -/- x Femelle *Pqlc2* -/- *Ctns* +/- » (**tableau 9**) confirment une fois encore la présence d'une létalité synthétique totale pour le double KO. La létalité synthétique partielle n'est cependant observé que pour le génotype *Pqlc2* +/- *Ctns* -/-. L'effectif du génotype *Pqlc2* -/- *Ctns* +/- est cette fois ci supérieur à l'effectif du génotype doublement hétérozygote. Cette tendance confirme ce qui avait été observé précédemment, à savoir que la létalité synthétique partielle est plus prononcée pour le KO du gène *Ctns* hétérozygote que pour le gène *Pqlc2*.

Cette fois ci, le modèle de transmission génétique de létalité embryonnaire ou périnatale du double KO n'est pas rejeté ($p = 0.24$) alors que les autres modèles le sont.

Pour ce dernier croisement, il faudra confirmer ces informations en augmentant l'effectif total de l'expérience car l'effectif actuel ($n=26$) est faible.

Ces deux premiers croisements confirment donc la létalité synthétique totalement pénétrante pour les doubles KO, et partielle chez les animaux 3-mut avec un effet plus fort chez le génotype *Pqlc2* +/- *Ctns* -/-. Ces résultats suggèrent également que la létalité des doubles KO intervient durant le développement embryonnaire ou dans la période périnatale, car les modèles de létalité gamétique sont rejetés avec une possibilité beaucoup plus basse.

Croisements symétriques

Les résultats des deux possibilités de croisements symétriques sont présentés dans les **tableaux 10** et **11**. Le fait que les proportions des génotypes observés dans les deux croisements soient strictement identiques est un hasard.

Mâle P ^{-/-} C ^{+/-} x Femelle P ^{-/-} C ^{+/-}			Modèles de transmission génétique des allèles Pq1c2 et Ctns		
	Observés		Mendélien	léthalité embryonnaire ou périnatale du double KO	léthalité gamétique double KO (spermatozoïde OU ovule)
genotype	effectif	%	%	%	%
P ^{-/-} C ^{+/+}	18	44	25	33	50
P ^{-/-} C ^{+/-}	23	56	50	67	50
P ^{-/-} C ^{-/-}	0	0	25	0	0
total	41	100	100	100	100
		test chi2	p=2.7E-04	p=0.36	p=0.74

Tableau 10 : Effectifs de souris obtenus par génotype pour les croisements symétriques Mâle Pq1c2 ^{-/-} Ctns ^{+/-} x Femelle Pq1c2 ^{-/-} Ctns ^{+/-}

Mâle P ^{+/-} C ^{-/-} x Femelle P ^{+/-} C ^{-/-}			Modèles de transmission génétique des allèles Pq1c2 et Ctns		
	Observés		Mendélien	léthalité embryonnaire ou périnatale du double KO	léthalité gamétique double KO (spermatozoïde OU ovule)
genotype	effectif	%	%	%	%
P ^{+/+} C ^{-/-}	13	34	25	33	50
P ^{+/-} C ^{-/-}	25	66	50	67	50
P ^{-/-} C ^{-/-}	0	0	25	0	0
total	38	100	100	100	100
		test chi2	p=1.8E-03	p=0.99	p=0.15

Tableau 11 : Effectifs de souris obtenus par génotype pour les croisements symétriques Mâle Pq1c2 ^{+/-} Ctns ^{-/-} x Femelle Pq1c2 ^{+/-} Ctns ^{-/-}

La létalité synthétique totalement pénétrante pour les doubles KO est à nouveau confirmée. Les modèles de létalité embryonnaire ne sont pas rejetés, de même que les modèles de létalité gamétique. Par contre, à la différence des observations faites sur les croisements asymétriques,

l'effet de dosage des allèles mutés est plus atténuée, voir disparaît sur le croisement Mâle *Pq1c2 +/- Ctns -/-* x Femelle *Pq1c2 +/- Ctns -/-*. En effet, pour ce croisements symétrique, les effectifs des génotypes 3-mut suivent strictement ceux estimés par le modèle de létalité embryonnaire ou périnatale simple, c'est-à-dire sans létalité partielle des génotypes 3-mut. Pour l'instant, nous n'avons pas d'explication pour cette dernière observation.

Conclusion sur les croisements simplifiés

A nouveau, les effets à l'origine des différences observées entre ces 4 types de croisements semblent multifactoriels et complexes. Mes résultats suggèrent que la létalité n'est pas gamétique. Elle interviendrait donc durant le développement embryonnaire ou à une période périnatale.

En conclusion, au moins 4 facteurs semblent affecter l'effet concerté de ces deux mutations : le génotype des parents, une synergie entre les deux mutations, un effet de dosage du nombre d'allèles mutés et le fond génétique (C57BL/6J ou N). Le génotype des parents a un fort impact sur l'effet de dosage pour une raison inconnue. Les embryons qui semblent le plus impactés parmi les génotypes 3-mut sont ceux qui sont KO pour le gène *Ctns* et hétérozygotes pour *Pq1c2*. Le mécanisme possible sous-jacent à l'interaction entre le gène *Pq1c2* et *Ctns* sera discuté à la fin de ce chapitre.

2.5. Preuve directe du stade embryonnaire de la létalité synthétique

Afin de déterminer la période de létalité des embryons ou nouveau nés, nous avons décidé d'étudier les embryons de souris issus de croisements simplifiés 3-mut. Pour des raisons pratiques (production d'animaux limitée), nous n'avons pas pu effectuer cette étude dans le cadre de croisements asymétriques. L'analyse de la létalité partielle (effet dosage) dans des conditions optimales (*Pq1c2 -/- Ctns +/-* x Femelle *Pq1c2 +/- Ctns -/-* ; **tableau 8**) n'a donc pas pu être réalisée. Cette étude a donc été réalisée dans le cadre de croisements symétriques *Pq1c2 -/- Ctns +/-*.

Les femelles sont mises en accouplement une nuit avec un mâle et sont retirées de la cage d'accouplement le lendemain. Le suivi du poids pendant les 10 premiers jours post-accouplement permet de détecter si les femelles sont gestantes. 12 jours après l'accouplement, les femelles sont sacrifiées et l'utérus est extrait afin d'étudier un à un les embryons qu'il contient. A l'issue de l'observation, un petit fragment de l'embryon est prélevé afin d'effectuer un génotypage.

Les résultats préliminaires de cette étude sont présentés dans la **figure 68**.

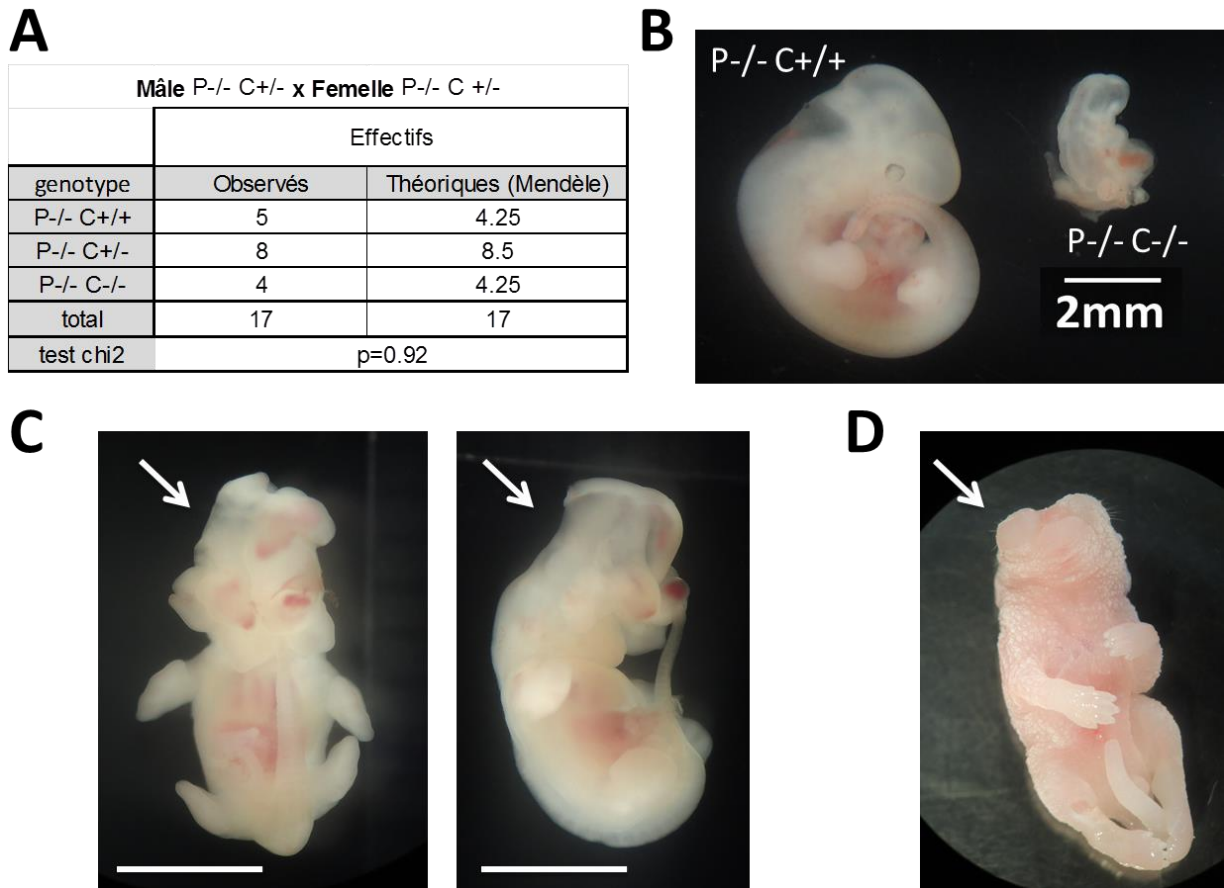


Figure 68 : Le développement embryonnaire des double KO atteint le stade E12, avec de fortes anomalies.

A) Tableau de croisement comparant les effectifs des génotypes embryonnaires obtenus aux effectifs théoriques selon la transmission génétique Mendélienne. Test chi-2 de conformité. **B)** Photo comparative d'un embryon *Pq1c2* KO et d'un embryon *Pq1c2-Ctns* double KO issus de la même portée au stade E12. **C)** Embryon double KO observé au stade E12. La flèche blanche indique la position de la tête. La barre d'échelle (blanche) correspond à une taille de 4 mm. Droite : Photo de face. Gauche : photo de profil. **D)** Nouveau-né découvert mort dans une cage par une animalière. La tête (flèche blanche) est anormale. Il a été photographié après congélation.

Jusqu'à présent, sur les 17 embryons étudiés (3 femelles sacrifiées), 4 embryons double KO ont été observés. Les proportions des effectifs de génotypes sont très proches de celles observées dans le cadre d'une transmission mendélienne (**figure 68.A** ; $p = 0.92$).

Sur les 4 embryons double KO observés, 2 n'ont pas pu être étudiés car ils ont été détériorés durant leur séparation du placenta, et deux autres ont été extraits intacts.

Le premier embryon (**figure 68.B**) semble dans un état de nécrose avancé. L'orientation du corps et l'identification de la tête étaient impossibles. De plus, sa taille était fortement réduite comparés aux autres embryons de la portée (embryons non double KO).

Le deuxième embryon était le seul embryon de la portée à s'être développé. Il n'a donc pas pu être comparé à des embryons de génotype différent. La taille était cependant comparable aux embryons de génotype différent et de même stade des autres portées. Le développement de la tête est fortement altéré (**figure 68.C**). Vu de face, elle peut faire penser à une organisation en forme de chou. Le reste du corps semble bien développé. Le cœur battait à une fréquence estimée approximativement à 80 battements par seconde.

Par hasard, un nouveau-né mort issu d'un croisement double hétérozygote a été découvert dans une cage d'accouplement de notre animalerie (**figure 68.D**). La tête de ce nouveau-né est anormale, et on ne peut malheureusement pas dire si ce phénotype est dû à un problème développemental, s'il a été abimé par les autres souris présentes dans la cage, ou si le prélèvement à l'aide de pinces par l'animalière qui l'a découvert l'a détérioré.

Ces résultats préliminaires très encourageants confirment le stade de létalité embryonnaire du double KO. A priori, à E12, les embryons double KO sont encore tous présents mais dans des états probablement incompatibles avec leur survie. Le faisceau d'observations sur la détérioration sélective de la tête permet de poser l'hypothèse d'une altération physiologique ou développementale spécifique de cette partie du corps.

2.6. La létalité synthétique est-elle due à l'activité de transport des deux protéines lysosomales ?

Principe de l'expérience

L'inactivation d'un transporteur lysosomal prive la cellule d'une source du métabolite transporté : son recyclage par le catabolisme cellulaire. Dans le cas de PQLC2 ou de la cystinosine, la supplémentation dans l'eau de boisson du substrat déficient (CAA ou cystine, respectivement) pourrait corriger ce déficit et ainsi corriger le phénotype de létalité synthétique. Nous avons donc effectué des expériences de supplémentation pour évaluer indirectement si la létalité synthétique du double KO provient d'un déficit d'efflux lysosomal d'un CAA particulier ou de la cystine.

Comme la correction par la supplémentation en acides aminés peut être très partielle, nous avons effectué ces expériences de sauvetage (« rescue ») sur des croisements asymétriques pour tester l'effet de la supplémentation non seulement sur le double KO total, mais aussi sur la létalité partielle des génotypes 3-mut, et avoir ainsi une meilleure sensibilité de détection de l'effet correcteur (la létalité partielle est visible).

Résultats

Pour l'instant, ces expériences de supplémentation n'ont été effectuées qu'avec l'arginine sur les deux types de croisements asymétriques possibles.

L'arginine est ajoutée dans l'eau de boisson à hauteur de 5.5 g/L (arginine monohydrochloride, Sigma-Aldrich). Cette valeur est adaptée de l'étude de Green et al. (Greene *et al.*, 2012) qui s'intéresse à l'effet d'une supplémentation en arginine pendant la gestation sur les performances reproductives des souris. Cette supplémentation augmente d'un facteur 2 la quantité d'arginine ingérée pour atteindre une valeur proche de 50 mg par jour pour une souris adulte de 22 g (dose classique utilisée dans la littérature qui étudie l'effet d'une supplémentation en arginine).

Les résultats obtenus sont présentés dans les **tableaux 12 et 13**.

Mâle P^{-/-} C^{+/-} x Femelle P^{+/-} C^{-/-}				
	supplémentation en Arg		léthalité embryonnaire ou périnatale du double KO	sans supplémentation en Arg
genotype	effectif	%	%	%
P ^{+/-} C ^{+/-}	8	32	33	57
P ^{+/-} C ^{-/-}	8	32	33	12
P ^{-/-} C ^{+/-}	9	36	33	31
P ^{-/-} C ^{-/-}	0	0	0	0
total	25	100	100	100
		test chi2	p=0.99	p=0.05

Tableau 12 : Effet de la supplémentation en arginine sur les croisements asymétriques Mâle *Pq1c2*^{-/-} *Ctns*^{+/-} x Femelle *Pq1c2*^{+/-} *Ctns*^{-/-}

Les cadres rouges mettent en évidence la correction des proportions de génotypes *Pq1c2*^{+/-} *Ctns*^{-/-} par l'arginine. Le test de chi-2 d'homogénéité a été utilisé pour la comparaison des effectifs observés sans et avec supplémentation en Arg.

Mâle P^{+/-} C^{-/-} x Femelle P^{-/-} C^{+/-}				
	supplémentation en Arg		léthalité embryonnaire ou périnatale du double KO	sans supplémentation en Arg
genotype	effectif	%	%	%
P ^{+/-} C ^{+/-}	17	36	33	35
P ^{+/-} C ^{-/-}	12	26	33	19
P ^{-/-} C ^{+/-}	18	38	33	46
P ^{-/-} C ^{-/-}	0	0	0	0
total	47	100	99	100
		test chi2	p=0.99	p=0.76

Tableau 13 : Effet de la supplémentation en arginine sur les croisements asymétriques Mâle *Pq1c2*^{+/-} *Ctns*^{-/-} x Femelle *Pq1c2*^{-/-} *Ctns*^{+/-}

Les cadres rouges mettent en évidence les proportions de génotypes *Pq1c2*^{+/-} *Ctns*^{-/-} qui sont corrigés par la supplémentation en Arg dans les croisements Mâle *Pq1c2*^{-/-} *Ctns*^{+/-} x Femelle *Pq1c2*^{+/-} *Ctns*^{-/-}. Le test de chi2 d'homogénéité a été utilisé pour la comparaison des effectifs observés sans et avec supplémentation en Arg.

Pour les croisements asymétriques Mâle *Pqlc2* *-/-* *Ctns* *+/-* x Femelle *Pqlc2* *+/-* *Ctns* *-/-* (**tableau 12**), la supplémentation n'affecte pas le phénomène de létalité synthétique totale des doubles KO. En revanche, elle corrige entièrement les létalités synthétiques partielles du génotype *Pqlc2* *+/-* *Ctns* *-/-* ($p = 0.05$).

Le croisement asymétrique complémentaire est moins adapté pour observer cette correction car la létalité synthétique partielle est moins forte dans cette configuration de croisement.

Ces résultats préliminaires sont très encourageants car ils suggèrent qu'à relativement faible dose, un substrat de l'un des deux transporteurs mutés peut corriger partiellement le phénotype de létalité synthétique. Ils montrent ainsi un lien direct entre la fonction de réapprovisionnement du cytoplasme en Arg par PQLC2 et le phénomène de létalité synthétique observé. Aux doses que nous avons utilisées, seule la létalité synthétique partielle de l'un des génotypes 3-mut semble corrigée. Une augmentation de la dose pourrait peut-être permettre de corriger également la létalité synthétique totale du double KO. Cette hypothèse est actuellement en train d'être testée dans mon laboratoire.

Des expériences de supplémentation avec d'autres substrats vont être mises en place pour continuer cette étude. Ainsi, des supplémentations en Lys, His ou un mélange des 3 CAA vont être réalisées pour suppléer le rôle cellulaire de PQLC2. Pour la cystinosine, des composés comme la N-acétylcystéine (la cystine exportée du lysosome étant immédiatement réduite en cystéine) seront testés.

2.7. Interprétation des résultats obtenus

La létalité synthétique des gènes *Pqlc2* et *Ctns* indique l'existence d'une « coopération » de PQLC2 et de la cystinosine dans un processus ou une fonction commune.

Comme les allèles mutés des deux gènes inactivent complètement la protéine correspondante, l'idée que PQLC2 et la cystinosine interviennent en série dans ce processus commun est écartée. Il reste ainsi deux possibilités : une redondance des fonctions moléculaires des deux transporteurs, ou une convergence de leurs activités distinctes vers un processus commun.

Hypothèse de convergence biochimique des fonctions moléculaires de PQLC2 et de la cystinosine

La redondance, c'est-à-dire l'hypothèse d'un substrat lysosomal commun pour ces deux transporteurs, est peu probable étant donné leur sélectivité très différente (**figure 69**).

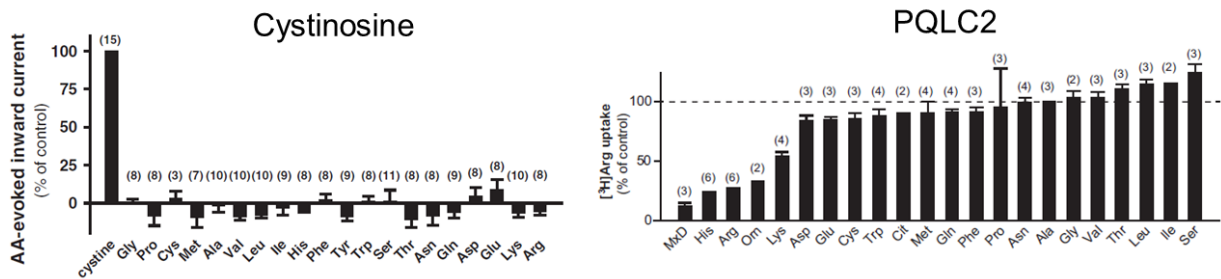


Figure 69 : Comparaison de la sélectivité de substrat de la cystinosine et de PQLC2

Gauche : Expériences de TEVC sur la cystinosine (Ruivo *et al.*, 2012). Droite : Expériences biochimiques de compétition sur PQLC2 (Jézégou *et al.*, 2012).

L'hypothèse d'une convergence entre l'activité de transport de CAA de PQLC2 et celle de transport de cystine de la cystinosine peut être envisagée d'au moins deux manières :

1) une première possibilité se base sur le rôle de PQLC2 comme « voie de secours » de l'efflux de la cystine lysosomale dans le traitement de la cystinose. La cystéamine est un composé naturel produit en faible quantité. Ainsi, le mécanisme de déplétion de cystine impliqué dans le traitement des patients cystinotiques pourrait aussi se produire de manière spontanée chez les patients non traités ou chez les souris KO *Ctns* non traitées. Autrement dit, la fonction commune pourrait être la déplétion lysosomale de cystine assurée directement par la cystinosine, ou indirectement par la cystéamine et PQLC2. Cependant, une telle hypothèse a déjà été testée de manière fortuite. En effet, une lignée de souris double KO pour *Ctns* et *Vnn1*, qui code pour la Vanine, l'unique enzyme de synthèse de la cystéamine, a été générée. Elle est viable et sans complications apparente par rapport au modèle *Ctns* (données non publiées de Daryl Okamura, MD au Seattle Children's Hospital). Un autre mécanisme entre donc probablement en jeu pour expliquer la létalité synthétique des gènes *Pqlc2* et *Ctns*.

2) Par des recherches bibliographiques, mon directeur de thèse a identifié un point de convergence entre le devenir des substrats exportés par les deux transporteurs mutés. En effet, il est apparu que l'arginine et la cystine sont impliqués toutes deux dans la protection des thiols des protéines contre des dommages oxydatifs irréversibles. En effet, la cystine et l'arginine sont deux précurseurs métaboliques à la synthèse d'antioxydants, respectivement le glutathion [GSH] et le monoxyde d'azote [NO], qui interviennent dans la protection des thiols contre une oxydation irréversible (Martínez-Ruiz and Lamas, 2007) ; **figure 70**. Il est donc possible que l'altération de ces deux voies de protection contre le stress oxydatif chez les souris double KO soit à l'origine de cette létalité embryonnaire. Si cela est vrai, nos travaux mettraient en évidence un nouveau rôle des lysosomes comme ligne de défense contre un effet particulier du stress oxydatif.

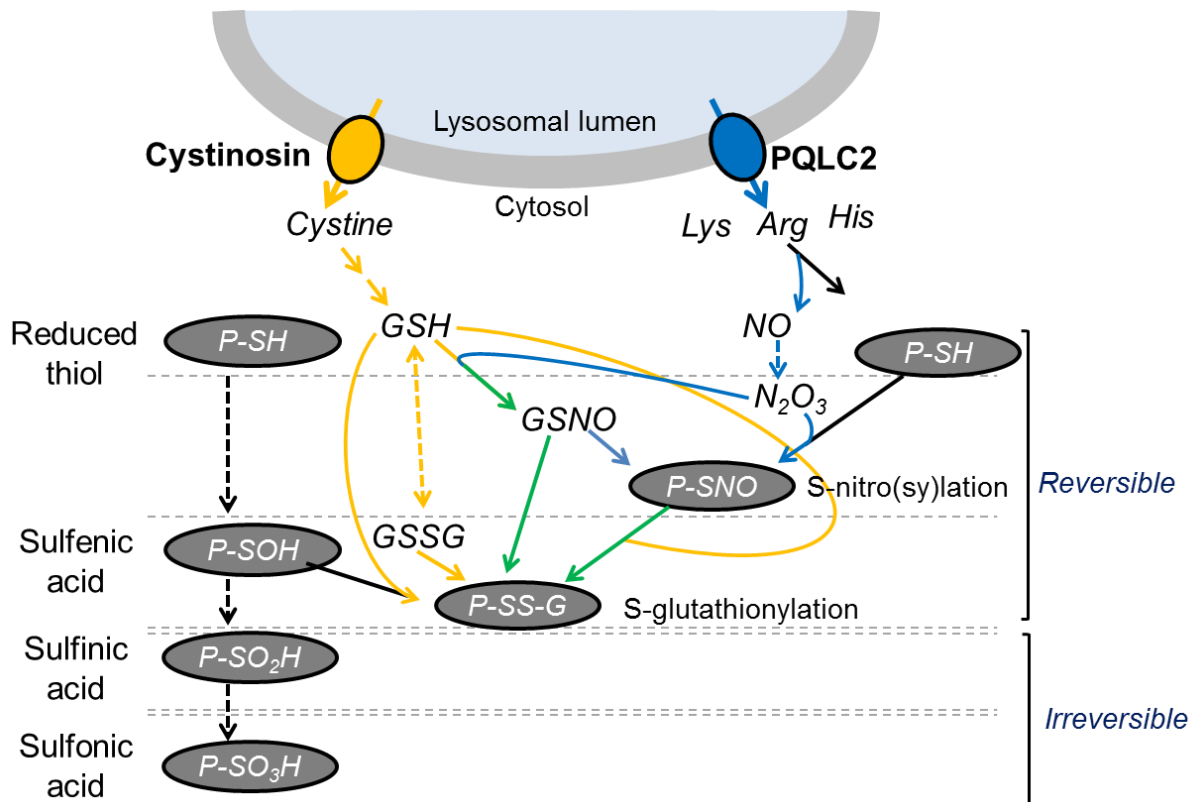


Figure 70 : Hypothèse postulant des rôles synergiques et convergents de la cystinosine et de PQLC2 dans la protection des thiols contre le stress oxydatif.

Les activités de transport lysosomal de la cystinosine et de PQLC2 convergent vers une protection des groupements thiols des protéines contre les dommages causés par le stress oxydatif. La cystinosine fournit la cystine cytosolique nécessaire à la synthèse de glutathion (GSH) (voie métabolique jaune), alors que PQLC2 fournit l'Arg, un précurseur d'oxyde nitrique (NO) (voie métabolique bleue). Le GSH et le NO coopèrent (flèches vertes) dans la protection des groupements thiols faiblement oxydés (état d'oxydation +1 qui est réversible ; Cys Sulfenic acid), afin de prévenir une oxydation irréversible et délétère pour la protéine. En effet, alors que l'oxydation en acide sulfénique est réversible, des états d'oxydations supérieurs ne le sont pas (état d'oxydation +2 : sulfinic acid ; état d'oxydation +3 : sulfonic acid). La modification des résidus Cys dans des états oxydés réversibles (S-nitrosylation et S-glutathionylation) par l'utilisation du NO et de la GSH, respectivement, constitue ainsi une première ligne de défense contre les chocs oxydatifs.

Les S-nitrosylation et S-glutathionylation sont réversibles. Ainsi, lorsque le stress oxydatif n'est plus présent, ces modifications sont reversées et permettent à la protéine de retrouver son activité d'origine. A l'inverse, lorsque cette première ligne de défense est affaiblie, des dommages oxydatifs irréversibles ont lieu, générant une altération massive des protéines de la cellule nécessitant alors leur dégradation par protéolyse et leur remplacement par protéosynthèse.

Schéma adapté de Martinez et al. par Yann Terres, étudiant en Master 2 (Martínez-Ruiz and Lamas, 2007).

Hypothèse sur l'origine de la létalité embryonnaire

L'hypothèse biochimique précédente permet d'expliquer comment PQLC2 et la cystinosine pourraient coopérer dans un processus cellulaire commun. Cependant, cela n'explique pas pourquoi la disruption de ce processus chez le double KO induirait une létalité embryonnaire.

Plusieurs observations trouvées dans la littérature ou dans nos croisements *Pqlc2-Ctns* offrent des pistes pour expliquer pourquoi la coopération entre PQLC2 et la cystinosine jouerait un rôle particulier chez l'embryon.

Tout d'abord, il existe un décalage net entre la survie des souris *Pqlc2 +/- Ctns -/-* pendant le développement embryonnaire et à l'âge adulte. En effet, ce génotype est à l'origine d'une létalité partielle forte durant le développement embryonnaire avec une chute des effectifs observés de plus de 50 % comparé à une transmission génétique mendélienne classique. Or, les souris qui échappent à cette létalité synthétique ne semblent pas avoir de problème de santé particulier et atteignent sans problème l'âge de 2 ans dans notre animalerie (ces animaux sont toujours vivants). Cette observation suggère l'existence d'une période critique du développement dans laquelle la coopération entre PQLC2 et la cystinosine est particulièrement importante.

Par ailleurs, une mortalité embryonnaire est observée chez plusieurs modèles de souris KO pour des enzymes impliquée dans la voie de synthèse ou dans l'utilisation du glutathion (Ufer, 2011). Ce point montre que le glutathion joue un rôle critique à certains stades de développement embryonnaire.

Enfin, chez les mammifères, l'embryon est exposé à de nombreux changements environnementaux. La teneur en oxygène en est un, notamment durant la mise en place de la connexion entre le système circulatoire de l'embryon et celui de la mère (**figure 71**) (Ufer, 2011).

L'ensemble de ces données suggèrent que PQLC2 et la cystinosine pourrait jouer un rôle synergique dans la protection contre le stress oxydatif intervenant de manière aiguë dans des phases critiques du développement embryonnaire, notamment lors de la mise en place de la circulation foeto-maternelle.

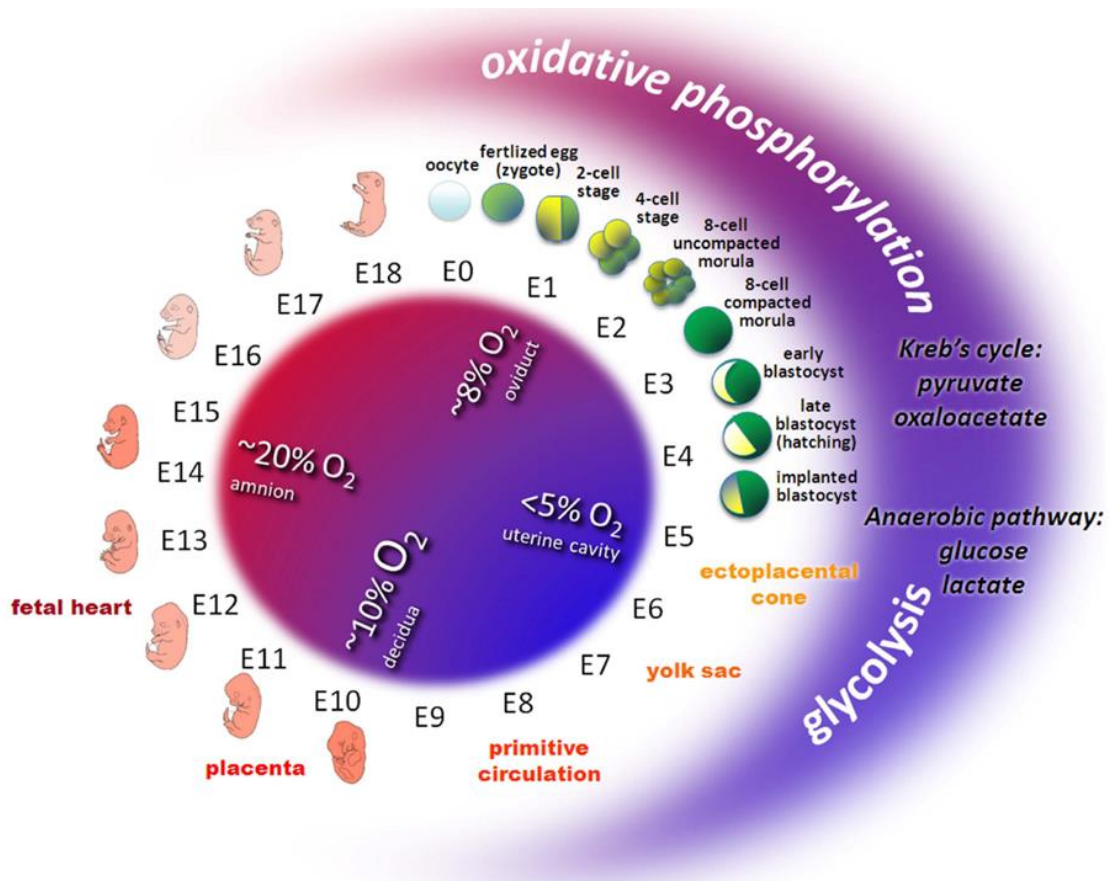


Figure 71 : Evolution du taux d'oxygénation de l'environnement embryonnaire lors du développement embryonnaire

Durant la fenêtre de développement embryonnaire de E9 à E14 et durant la mise en place de la connexion entre le système circulatoire de l'embryon et celui de la mère, le niveau d'oxygène de l'environnement de l'embryon est augmenté d'un facteur 4. D'après Ufer et Wang (Ufer, 2011).

Conclusions et perspectives

Les deux axes de recherches de ma thèse étaient l'étude du mécanisme de transport de PQLC2 à l'échelle moléculaire, et l'étude de son rôle physiologique à l'échelle de l'organisme.

Mes résultats sur la caractérisation fonctionnelle de PQLC2 indiquent clairement que c'est un uniporteur d'acides aminés cationiques fortement influencé par le potentiel de membrane. Ils démasquent ainsi la singularité de son mode de transport vis-à-vis des autres transporteurs du lysosome, qui sont majoritairement couplés au gradient de proton. Ils mettent également à jour une propriété originale de *trans*-stimulation sélective de PQLC2 (« effet *trans* »), indépendamment de l'identité du CAA transporté et de l'orientation du transport (vers le lysosome ou vers le cytoplasme). Cette dernière propriété n'est pas encore totalement démontrée.

A la différence du nématode, la croissance du modèle murin KO *Pqlc2* n'est pas retardée, et la morphologie des lysosomes n'est pas altérée. Ces souris sont viables et fertiles, et nous n'avons pas identifié de phénotype chez ce simple KO. Par contre, la létalité embryonnaire du double KO *Pqlc2-Ctns*, et la correction par l'arginine de la létalité partielle des souris de génotype *Pqlc2 +/- Ctns -/-*, supportent l'existence d'une fonction spécifique de la voie de transport de l'arginine par PQLC2 qui converge avec celle de la cystinosine.

Ces deux découvertes suggèrent un rôle important de PQLC2 dans l'homéostasie de l'arginine intracellulaire. Les propriétés de PQLC2 rendent le transport de cette molécule réversible et particulièrement flexible selon le potentiel électrique de membrane du lysosome et en fonction du statut nutritionnel de la cellule. La régulation du pool lysosomal d'arginine pourrait ainsi participer à deux processus cellulaires importants : la régulation de mTOR, et la constitution et la gestion d'un stock lysosomal d'arginine.

1. Rôle possible de PQLC2 dans la modulation de la voie mTOR

Les découvertes scientifiques récentes de ces 10 dernières années sur le complexe mTORC1 et le rôle associé du lysosome en tant que plateforme de signalisation du métabolisme et de la croissance cellulaire placent l'arginine comme une molécule régulatrice importante de ces processus.

Lors d'une carence nutritionnelle, mTORC1 est inhibé et l'autophagie est stimulée (**figure 72, 1.**). La protéolyse lysosomale permet alors de produire des acides aminés qui sont exportés vers le cytoplasme par les transporteurs membranaires du lysosome (**figure 72, 2.**). PQLC2 est un de ces

transporteurs. Dans ces conditions, il participe ainsi au réapprovisionnement du cytosol en CAA. Il fonctionne alors comme un uniporteur.

Un premier paramètre déduit de mes résultats de thèse est que le potentiel de membrane du lysosome sera déterminant pour définir avec quelle vélocité PQLC2 accomplira cette tâche. Ce paramètre est d'autant plus important que l'Arg_{cyto} inhibe l'activité de CASTOR1, un inhibiteur cytosolique de la voie d'activation de mTORC1.

Le potentiel de membrane du lysosome et sa régulation sont, par la difficulté et la complexité de son étude, encore très mal compris. Les quelques études qui s'y sont attelées indiquent qu'il aurait une valeur de repos légèrement négative, comprise entre -20 et -40 mV, donc favorable à l'export des CAA (un potentiel négatif indique, par convention, que la lumière du lysosome a un potentiel plus positif que le compartiment cytosolique ; voir pour revue : Xu & Ren, 2015). Le potentiel de membrane du lysosome semble être un paramètre dynamique hautement régulé, notamment en fonction de l'état nutritionnel de la cellule (Cang *et al.*, 2013). Les futures découvertes dans ce domaine apporteront ainsi de précieuses informations pour comprendre la dynamique de l'approvisionnement en CAA de la cellule par PQLC2, et donc la régulation de mTORC1 par l'arginine cytosolique.

Un autre rôle possible de PQLC2, qui découlerait de sa propriété originale d'effet *trans*, et plus subtile, est son influence sur la cinétique de réactivation de mTORC1 par l'arginine lysosomale.

Une hypothèse, proposée par David Sabatini, postule l'activation de mTORC1 par un mécanisme de détection du pool intralysosomal d'acides aminés, particulièrement sensible à l'arginine et la leucine (Hara *et al.*, 1998; Zoncu, 2012). Un des senseurs de ces acides aminés serait le transcepteur SLC38A9 qui détecterait le niveau d'arginine lysosomale et, par la liaison de l'arginine, permettrait d'activer mTORC1. Or, petit à petit, une fois l'autophagie activée, la protéolyse lysosomale remplit son rôle et permet de fournir au cytosol les acides aminés manquants. La concentration cytosolique de l'arginine va ainsi augmenter en raison de l'activité d'efflux lysosomal de PQLC2 (**figure 72, 3.**).

Tant que la concentration d'arginine cytosolique reste basse, PQLC2 agit comme un uniporteur.

Cependant, comme PQLC2 possède une propriété supplémentaire d'effet *trans*, au fur et à mesure que la concentration de l' Arg_{cyto} augmente, la proportion de PQLC2 assurant un cycle d'uniport va diminuer au profit d'un cycle d'échange CAA_{lyso}/Arg_{cyto} (**figure 72, 4.**). **Le lysosome va ainsi « garder » son arginine.**

De plus, à partir d'une certaine concentration d'Arg_{cyto}, le flux net d'Arg transportée par PQLC2 s'inversera pour être en faveur du transport de l'Arg vers le lysosome. Concrètement, si 100% des molécules PQLC2 fonctionnent comme des échangeurs CAA_{lyso}/Arg_{cyto}, 3 molécules de CAA seront exportées du lysosome (R, K, H) et échangées contre 3 molécules d'Arg, soit un influx net de 2 molécules d'Arg dans le lysosome. Dans ces conditions, **l'arginine cytosolique**, également biosynthétisée dans le cytosol à partir d'autres acides aminés (proline, glutamine/glutamate), **sera**

donc concentrée par PQLC2 dans la lumière du lysosome. La concentration critique en Arg_{lyso} suffisante pour activer SLC38A9, et donc mTORC1, sera ainsi atteinte plus rapidement.

En associant les propriétés d'uniport et d'effet *trans*, PQLC2 pourrait ainsi permettre d'accélérer l'augmentation de la concentration de l' Arg_{lyso} et, ce faisant, de réactiver mTORC1 de manière anticipée.

Cette réactivation anticipée de mTORC1 à un sens biologique car elle permettrait à la cellule de limiter la digestion de ces propres constituants, qui est un processus extrêmement dangereux. On peut le voir comme l'arrivée d'un paquebot au port, qui possède une inertie élevée et qui doit donc couper ses moteurs bien en amont de son entrée sous risque de ne pas pouvoir s'arrêter à temps (hypothèse mécanistique et métaphore originale de Bruno Gasnier, utilisée ici avec son autorisation ©). Le matériel biologique ainsi sauvée ne nécessitera pas d'être resynthétisé et permettra à la cellule de retrouver sa fonction de anabolique plus rapidement.

La modélisation informatique de ce processus est, comme pour celle des propriétés de transport de PQLC2, en cours dans mon laboratoire.

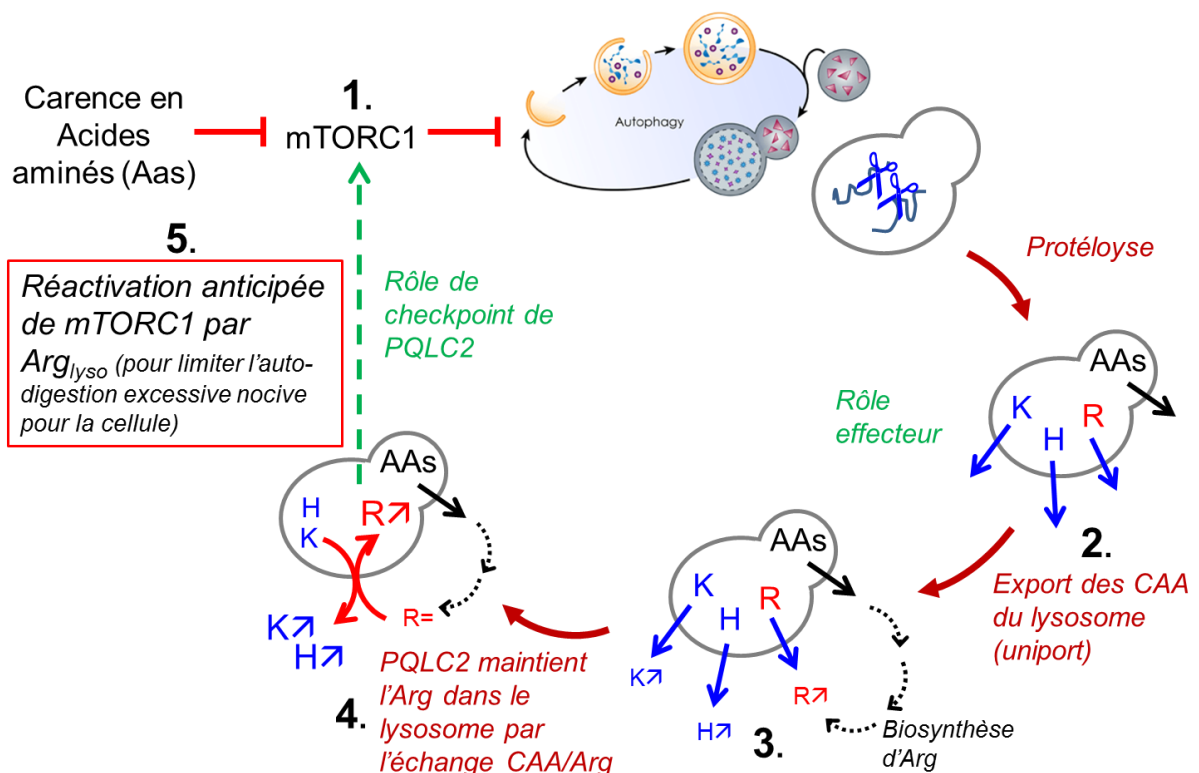


Figure 72 : Rôle possible de l'effet *trans* de l'arginine sur PQLC2 lors de la réponse cellulaire à une carence nutritionnelle.

Ainsi, en régulant le taux d'arginine intralysosomale, PQLC2 pourrait jouer un rôle modulateur de mTORC1. On peut décrire aussi ce rôle comme un mécanisme de « check point » : en accumulant

l'arginine dans le lysosome, PQLC2 informe mTORC1 du bon déroulement de la mobilisation des réserves d'acides aminés par l'autophagie.

Les propriétés particulières d'échange spécifique de l'arginine-*trans*, cytosolique, avec les CAA-cis du lysosome lors de leur export par PQLC2, peuvent donc hypothétiquement jouer un rôle précis lorsque ces quantités fluctuent, comme c'est le cas lors de la carence nutritionnelle.

2. Rôle possible de PQLC2 dans la constitution et l'utilisation de stocks d'arginine intralysosomal

Le fait que le modèle murin KO *Pqlc2* ne présente aucun phénotype remarquable à l'échelle de l'organisme, du tissu ou de la cellule, suggère que le rôle physiologique de PQLC2 soit compensable par d'autres acteurs de la cellule. Il se peut également que le cadre de vie sain et sûr d'une animalerie dédié à la Recherche, avec un accès constant à de la nourriture et une exposition limitée à des pathogènes, ne permettent pas de révéler l'étendue de ses fonctions.

Mes résultats sur la létalité synthétique embryonnaire des souris double KO *Pqlc2-Ctns* ont permis de proposer une hypothèse biochimique de coopération entre PQLC2 et la cystinosine dans la protection cellulaire contre le stress oxydatif. Cette hypothèse inclut le rôle de l'arginine, plutôt que celui de la lysine ou de l'histidine, car elle seule est une molécule précurseur pour la synthèse de monoxyde d'azote (NO). Cet aspect est corroboré, mais non démontré, par la correction de la létalité synthétique partielle des souris *Pqlc2 +/- Ctns -/-* par l'arginine.

Ils suggèrent également une nouvelle fonction de stockage d'arginine du lysosome, qui pourrait être utilisée dans des conditions particulières par les cellules de l'organisme.

Métabolisme de l'arginine

L'arginine de l'organisme est issue principalement de trois sources. L'alimentation, sa biosynthèse, qui est issu de la collaboration entre le petit intestin et le rein, et la protéolyse cellulaire.

La biosynthèse est issue du catabolisme de trois acides aminés, à savoir la glutamine, le glutamate et la proline, qui, tous, permettent la production du précurseur d'arginine, la citrulline (Wu and Morris, 1998). L'alimentation participe ainsi à l'apport d'arginine par l'approvisionnement de l'organisme de ces trois acides aminés et de la citrulline. L'arginine alimentaire fait également partie, à moindre échelle de cette « source » exogène d'arginine. Les cellules captent cette arginine par les transporteurs de la famille des CAT exprimés à la membrane plasmique (Closs *et al.*, 2006).

La protéolyse cellulaire, médiée par les lysosomes et le protéasome, est la principale source d'arginine pour l'organisme. Elle participe à plus de 80% du taux plasmatique d'arginine (Wu and Morris, 1998).

Chez l'adulte, la production endogène d'arginine est suffisante pour subvenir aux besoins de l'organisme. En revanche, chez les enfants ou dans certaines pathologies, elle est insuffisante. On parle ainsi d'acide aminé semi-essentiel (Morris, 2006).

L'arginine est une molécule extrêmement polyvalente, servant de précurseur pour la production de proline, de glutamate, de créatine, de polyamines et de NO (Morris, 2006). Deux enzymes cytosoliques participent majoritairement aux catabolismes de l'arginine : l'arginase, qui catalyse la réaction d'une molécule d'arginine en une molécule d'ornithine et une molécule d'urée, et les NO synthases (NOS) qui catalysent la réaction d'une molécule d'arginine en une molécule de NO et une molécule de citrulline (Morris, 2006). Le NO est une molécule de signalisation fondamentale impliquée dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques comme la relaxation musculaire (Tousoulis *et al.*, 2012), la réponse immunologique contre les infections (Gogoi *et al.*, 2016), mais également dans la protection contre le stress oxydatif (Martínez-Ruiz and Lamas, 2007).

Il existe 3 isoformes de NOS. Deux sont exprimées de manière constitutive, la NOS neuronale (NOS1) et la NOS endothéliale (NOS3), et une est inductible, la NOS2 appelée également iNOS. Cette dernière participe à la défense de la cellule contre l'intrusion de pathogènes intracellulaires. Elle possède une activité enzymatique élevée, dont l'étape limitante est l'apport d'arginine (Gogoi *et al.*, 2016).

Ainsi, il se pourrait que, dans certains cas physiologiques ou pathologiques, une production massive de NO soit nécessaire et qu'elle nécessite un apport supérieur aux seules sources possibles d'arginine classiquement admises pour la cellule. Un cas possible est celui de la défense contre les pathogènes, où les macrophages sont recrutés sur le site d'infection et produisent en grandes quantités du NO et des espèces réactives de l'oxygène (Pekarova and Lojek, 2015).

Mes résultats suggèrent que PQLC2 pourrait servir de troisième source d'arginine cellulaire en participant au stockage d'arginine dans le lysosome et en mobilisant ce stock lors d'un besoin aigu d'arginine.

Le stockage d'arginine lysosomale

Le stockage d'arginine dans les lysosomes n'est pas encore bien compris mais est observé dans plusieurs études où elle pourrait se retrouver complexée aux polyphosphates (Dürr *et al.*, 1979; Harms, Gochman and Schneider, 1981; Kitamoto *et al.*, 1988; Pisoni and Lindley, 1992). Chez les mammifères, ce stockage pourrait se faire de manière passive, en accumulant l'arginine issue de la protéolyse lysosomale, ou de manière active par concentration de l'arginine cytosolique à partir de transporteurs présents à la membrane du lysosome, dont l'identité resterait alors inconnue.

PQLC2 pourrait être tout ou partie de ce système actif. En effet, comme PQLC2 est un uniporteur, à la différence de la majorité des transporteurs du lysosome, le sens de transport de ses substrats n'est pas déterminé par le fort gradient de protons de la membrane lysosomale. Il est donc réversible dans son environnement naturel. Dans des conditions nutritionnelles favorables, si le potentiel de membrane du lysosome est fortement dépolarisé (la lumière du lysosome est alors négative), il concentrerait l'arginine dans les lysosomes.

Plus simplement, sans véritable influence du potentiel de membrane et étant donné ses propriétés d'uniport réversible dans son environnement naturel, la concentration en CAA_{lyso} pourrait être proche de celle en CAA_{cyto} . Comme le volume des lysosomes est estimée à 5% du volume total de la cellule (Luzio, Pryor and Bright, 2007), cette source, dans des conditions de besoin aiguë, ne serait pas négligeable.

Mobilisation des réserves d'arginine lysosomale

Mes résultats sur le mode et les propriétés de transport de PQLC2 suggèrent deux possibilités pour mobiliser rapidement l' Arg_{lyso} .

D'une part, le potentiel de membrane du lysosome. Il suffit qu'il soit transitoirement fortement hyperpolarisé (la lumière du lysosome est alors positive) pour induire un fort efflux d'Arg du lysosome vers le cytoplasme à travers PQLC2.

D'autre part, l'effet *trans* rend également possible un second mécanisme dans lequel, sous l'impulsion d'une forte entrée de lysine cytosolique ou d'histidine cytosolique dans le lysosome médiée par PQLC2, l'arginine lysosomale est échangée et libérée dans le cytosol.

En conclusion, l'ensemble de mes résultats suggèrent un rôle important de PQLC2 dans l'homéostasie des acides aminés intracellulaires, en particulier l'arginine, dont l'impact varie de manière extrême, de dispensable à vital, selon le contexte.

Références

Bainton, D. F. (1981) 'The discovery of lysosomes.', *The Journal of cell biology*, 91(3 Pt 2), p. 66s–76s. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7033245>.

Bar-Peled, L., Chantranupong, L., Cherniack, A. D., Chen, W. W., Ottina, K. A., Grabiner, B. C., Spear, E. D., Carter, S. L., Meyerson, M. and Sabatini, D. M. (2013) 'A Tumor suppressor complex with GAP activity for the Rag GTPases that signal amino acid sufficiency to mTORC1.', *Science (New York, N.Y.)*. NIH Public Access, 340(6136), pp. 1100–6. doi: 10.1126/science.1232044.

Bar-Peled, L., Schweitzer, L. D., Zoncu, R. and Sabatini, D. M. (2012) 'Ragulator is a GEF for the rag GTPases that signal amino acid levels to mTORC1', *Cell*, 150(6), pp. 1196–1208. doi: 10.1016/j.cell.2012.07.032.

ter Beek, J., Guskov, A. and Slotboom, D. J. (2014) 'Structural diversity of ABC transporters', *The Journal of General Physiology*. Rockefeller University Press, 143(4), pp. 419–435. doi: 10.1085/jgp.201411164.

Besouw, M. T. P., Van Pelt, A. M. M., Gaide Chevronnay, H. P., Courtoy, P. J., Pastore, A., Goossens, E., Devuyt, O., Antignac, C. and Levchenko, E. N. (2012) 'Studying nonobstructive azoospermia in cystinosis: Histologic examination of testes and epididymis and sperm analysis in a Ctns -/- mouse model', *Fertility and Sterility*, 98(1), pp. 162–165. doi: 10.1016/j.fertnstert.2012.03.050.

Blarre, T., Bertrand, H. O., Acher, F. C. and Kehoe, J. (2014) 'Molecular determinants of agonist selectivity in glutamate-gated chloride channels which likely explain the agonist selectivity of the vertebrate glycine and GABA_A receptors', *PLoS ONE*. Public Library of Science, 9(9), p. e108458. doi: 10.1371/journal.pone.0108458.

Bravo, R. and Allende, J. E. (1976) 'Conditions Affecting Protein Synthesis in Amphibian Oocytes', *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 172(2), pp. 648–653.

Cang, C., Zhou, Y., Navarro, B., Seo, Y. J., Aranda, K., Shi, L., Battaglia-Hsu, S., Nissim, I., Clapham, D. E. and Ren, D. (2013) 'MTOR regulates lysosomal ATP-sensitive two-pore Na⁺ channels to adapt to metabolic state', *Cell*. Elsevier Inc., 152(4), pp. 778–790. doi: 10.1016/j.cell.2013.01.023.

Chantranupong, L., Scaria, S. M., Saxton, R. A., Gygi, M. P., Shen, K., Wyant, G. A., Wang, T., Harper, J. W., Gygi, S. P. and Sabatini, D. M. (2016) 'The CASTOR Proteins Are Arginine Sensors for the mTORC1 Pathway', *Cell*, 165(1), pp. 153–164. doi: 10.1016/j.cell.2016.02.035.

Chapel, A., Kieffer-Jaquinod, S., Sagne, C., Verdon, Q., Ivaldi, C., Mellal, M., Thirion, J., Jadot, M., Bruley, C., Garin, J., Gasnier, B. and Journet, A. (2013) 'An Extended Proteome Map of the Lysosomal Membrane Reveals Novel Potential Transporters', *Molecular & Cellular Proteomics*, 12(6), pp. 1572–1588. doi: 10.1074/mcp.M112.021980.

Chaudhry, F. A., Krizaj, D., Larsson, P., Reimer, R. J., Wreden, C., Storm-Mathisen, J., Copenhagen, D., Kavanaugh, M. and Edwards, R. H. (2002) 'Coupled and uncoupled proton movement by amino acid transport system N', *EMBO Journal*. EMBO Press, 20(24), pp. 7041–7051. doi: 10.1093/emboj/20.24.7041.

Cherqui, S. (2012) 'Cysteamine therapy: a treatment for cystinosis, not a cure', *Kidney International*. NIH Public Access, 81(2), pp. 127–129. doi: 10.1038/ki.2011.301.

Cherqui, S., Sevin, C., Hamard, G., Kalatzis, V., Sich, M., Pequignot, M. O., Gogat, K., Abitbol, M.,

- Broyer, M., Gubler, M.-C. and Antignac, C. (2002) 'Intralysosomal cystine accumulation in mice lacking cystinosis, the protein defective in cystinosis.', *Molecular and cellular biology*. American Society for Microbiology (ASM), 22(21), pp. 7622–7632. doi: 10.1128/MCB.22.21.7622-7632.2002.
- Cheung, W. W., Cherqui, S., Ding, W., Esparza, M., Zhou, P., Shao, J., Lieber, R. L. and Mak, R. H. (2016) 'Muscle wasting and adipose tissue browning in infantile nephropathic cystinosis', *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*, 7(2), pp. 152–164. doi: 10.1002/jcsm.12056.
- Closs, E. I., Boissel, J. P., Habermeier, A. and Rotmann, A. (2006) 'Structure and function of cationic amino acid transporters (CATs)', *Journal of Membrane Biology*, 213(2), pp. 67–77. doi: 10.1007/s00232-006-0875-7.
- Deretic, V., Saitoh, T. and Akira, S. (2013) 'Autophagy in infection, inflammation and immunity', *Nat Rev Immunol*. Nature Publishing Group, 13(10), pp. 722–737. doi: 10.1038/nri3532.
- Drew, D. and Boudker, O. (2016) 'Shared Molecular Mechanisms of Membrane Transporters', *Annual Review of Biochemistry*, 85(1), p. annurev-biochem-060815-014520. doi: 10.1146/annurev-biochem-060815-014520.
- Dürr, M., Urech, K., Boller, T., Wiemken, A., Schwencke, J. and Nagy, M. (1979) 'Sequestration of arginine by polyphosphate in vacuoles of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*)', *Archives of Microbiology*, 121(2), pp. 169–175. doi: 10.1007/BF00689982.
- de Duve, C. (2005) 'The lysosome turns fifty.', *Nature cell biology*, 7(9), pp. 847–9. doi: 10.1038/ncb0905-847.
- De Duve, C., Pressman, B. C., Gianetto, R., Wattiaux, R. and Appelmans, F. (1955) 'Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue.', *The Biochemical journal*. Portland Press Ltd, 60(4), pp. 604–617. doi: 10.1042/bj0600604.
- Elmonem, M. A., Veys, K. R., Soliman, N. A., van Dyck, M., van den Heuvel, L. P. and Levtchenko, E. (2016) 'Cystinosis: a review', *Orphanet Journal of Rare Diseases*. BioMed Central, 11(1), p. 47. doi: 10.1186/s13023-016-0426-y.
- Emma, F., Nesterova, G., Langman, C., Labbé, A., Cherqui, S., Goodyer, P., Janssen, M. C., Greco, M., Topaloglu, R., Elenberg, E., Dohil, R., Trauner, D., Antignac, C., Cochat, P., Kaskel, F., Servais, A., Wühl, E., Niaudet, P., Van't Hoff, W., Gahl, W. and Levtchenko, E. (2014) 'Nephropathic cystinosis: an international consensus document.', *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. Oxford University Press, 29 Suppl 4, p. iv87-94. doi: 10.1093/ndt/gfu090.
- Ezaki, J., Matsumoto, N., Takeda-Ezaki, M., Komatsu, M., Takahashi, K., Hiraoka, Y., Taka, H., Fujimura, T., Takehana, K., Yoshida, M., Iwata, J., Tanida, I., Furuya, N., Zheng, D. M., Tada, N., Tanaka, K., Kominami, E. and Ueno, T. (2011) 'Liver autophagy contributes to the maintenance of blood glucose and amino acid levels', *Autophagy*, 7(7), pp. 727–736. doi: 10.4161/auto.7.7.15371.
- Feng, L. and Frommer, W. B. (2015) 'Structure and function of SemiSWEET and SWEET sugar transporters', *Trends in Biochemical Sciences*. Elsevier Ltd, 40(8), pp. 480–486. doi: 10.1016/j.tibs.2015.05.005.
- Feng, L. and Frommer, W. B. (2016) 'Evolution of Transporters: The Relationship of SWEETs, PQ-loop, and PnuC Transporters', *Trends in Biochemical Sciences*. Elsevier Ltd, 41(2), pp. 118–119. doi: 10.1016/j.tibs.2015.11.014.
- Fitzwalter, B. E. and Thorburn, A. (2015) 'Recent insights into cell death and autophagy', *FEBS*

Journal, 282(22), pp. 4279–4288. doi: 10.1111/febs.13515.

Forrest, R., Lucy; Rudnick, G. (2009) 'The Rocking Bundle: A Mechanism for Ion-Coupled Solute Flux by Symmetrical Transporters', (23), pp. 377–386. doi: 10.1152/physiol.00030.2009.

Forrest, L. R. (2013) '(Pseudo-)Symmetrical Transport', *Science*. American Association for the Advancement of Science, 339(6118), pp. 399–401. doi: 10.1126/science.1228465.

Gahl, W. (1989) 'Lysosomal membrane transport in cellular nutrition.', *Annual review of nutrition*, 9, pp. 39–61. doi: 10.1146/annurev.nu.09.070189.000351.

Gaide Chevronnay, H. P., Janssens, V., Van Der Smissen, P., Liao, X. H., Abid, Y., Nevo, N., Antignac, C., Refetoff, S., Cherqui, S., Pierreux, C. E. and Courtoy, P. J. (2015) 'A mouse model suggests two mechanisms for thyroid alterations in infantile cystinosis: Decreased thyroglobulin synthesis due to endoplasmic reticulum stress/unfolded protein response and impaired lysosomal processing', *Endocrinology*. Endocrine Society Chevy Chase, MD, 156(6), pp. 2349–2364. doi: 10.1210/en.2014-1672.

Gogoi, M., Datey, A., Wilson, K. T. and Chakravorty, D. (2016) 'Dual role of arginine metabolism in establishing pathogenesis', *Current Opinion in Microbiology*, 29, pp. 43–48. doi: 10.1016/j.mib.2015.10.005.

Gomez-Sintes, R., Ledesma, M. D. and Boya, P. (2015) 'Lysosomal cell death mechanisms in aging', *Ageing Research Reviews*. doi: 10.1016/j.arr.2016.02.009.

Goodrick, C. L. (1975) 'Life-span and the inheritance of longevity of inbred mice.', *Journal of Gerontology*, 30(3), pp. 257–63. doi: 10.1093/geronj/30.3.257.

Greene, J. M., Dunaway, C. W., Bowers, S. D., Rude, B. J., Feugang, J. M. and Ryan, P. L. (2012) 'Dietary L-Arginine Supplementation during Gestation in Mice Enhances Reproductive Performance and Vegfr2 Transcription Activity in the Fetoplacental Unit', *Journal of Nutrition*. American Society for Nutrition, 142(3), pp. 456–460. doi: 10.3945/jn.111.154823.

Han, J. M., Jeong, S. J., Park, M. C., Kim, G., Kwon, N. H., Kim, H. K., Ha, S. H., Ryu, S. H. and Kim, S. (2012) 'Leucyl-tRNA synthetase is an intracellular leucine sensor for the mTORC1-signaling pathway', *Cell*, 149(2), pp. 410–424. doi: 10.1016/j.cell.2012.02.044.

Hara, K., Yonezawa, K., Weng, Q. P., Kozlowski, M. T., Belham, C. and Avruch, J. (1998) 'Amino acid sufficiency and mTOR regulate p70 S6 kinase and eIF-4E BP1 through a common effector mechanism', *Journal of Biological Chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 273(23), pp. 14484–14494. doi: 10.1074/jbc.273.23.14484.

Harms, E., Gochman, N. and Schneider, J. A. (1981) 'Lysosomal pool of free-amino acids.', *Biochemical and biophysical research communications*, 99(3), pp. 830–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7247944>.

Harrison, L. I. and Christensen, H. N. (1975) 'Simulation of differential effects on rates in membrane transport', *Journal of Theoretical Biology*, 49(2), pp. 439–459. doi: 10.1016/0022-5193(75)90185-X.

He, C. and Klionsky, D. J. (2009) 'Regulation Mechanisms and Signalling Pathways of Autophagy', *Annual review of genetics*. Annual Reviews, 43(68), p. 67. doi: 10.1146/annurev-genet-102808-114910.Regulation.

Holsbeeks, I., Lagatie, O., Van Nuland, A., Van De Velde, S. and Thevelein, J. M. (2004) 'The eukaryotic plasma membrane as a nutrient-sensing device', *Trends in Biochemical Sciences*, 29(10), pp. 556–564.

doi: 10.1016/j.tibs.2004.08.010.

Jaenecke, I., Boissel, J. P., Lemke, M., Rupp, J., Gasnier, B. and 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*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 287(36), pp. 30853–30860. doi: 10.1074/jbc.M112.350322.

Jewell, J. L., Kim, Y. C., Russell, R. C., Yu, F.-X., Park, H. W., Plouffe, S. W., Tagliabracci, V. S. and Guan, K.-L. (2015) 'Differential regulation of mTORC1 by leucine and glutamine', *Science (New York, N.Y.)*. American Association for the Advancement of Science, 347(6218), pp. 194–8. doi: 10.1126/science.1259472.

Jewell, J. L., Russell, R. C. and Guan, K.-L. (2013) 'Amino acid signalling upstream of mTOR.', *Nature reviews. Molecular cell biology*. Nature Publishing Group, 14(3), pp. 133–9. doi: 10.1038/nrm3522.

Jézégou, A., Llinares, E., Anne, C., Kieffer-Jaquinod, S., O'Regan, S., Aupetit, J., Chabli, A., Sagné, C., Debacker, C., Chadeaux-Vekemans, B., Journet, A., André, B. and 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 of the United States of America*, 109(50), pp. E3434–43. doi: 10.1073/pnas.1211198109.

Jin, Z.-B., Huang, X.-F., Lv, J.-N., Xiang, L., Li, D.-Q., Chen, J., Huang, C., Wu, J., Lu, F. and Qu, J. (2014) 'SLC7A14 linked to autosomal recessive retinitis pigmentosa.', *Nature communications*. Nature Publishing Group, 5(3517), pp. 1–9. doi: 10.1038/ncomms4517.

Jung, J., Genau, H. M. and Behrends, C. (2015) 'Amino Acid-Dependent mTORC1 Regulation by the Lysosomal Membrane Protein SLC38A9.', *Molecular and cellular biology*. American Society for Microbiology, 35(14), pp. 2479–94. doi: 10.1128/MCB.00125-15.

Kaushik, S. and Cuervo, A. M. (2012) 'Chaperone-mediated autophagy: A unique way to enter the lysosome world', *Trends in Cell Biology*. NIH Public Access, 22(8), pp. 407–417. doi: 10.1016/j.tcb.2012.05.006.

Kitamoto, K., Yoshizawa, K., Ohsumi, Y. and Anraku, Y. (1988) 'Dynamic aspects of vacuolar and cytosolic amino acid pools of *Saccharomyces cerevisiae*.', *Journal of Bacteriology*, 170(6), pp. 2683–2686.

Klaus W. Beyenbach and Helmut Wiczorek (2006) 'The V-type H⁺ ATPase: molecular structure and function, physiological roles and regulation', *The Journal of Experimental Biology*, 209, pp. 577–589. doi: 10.1242/jeb.02014.

Klumperman, J. and Raposo, G. (2014) 'The complex ultrastructure of the endolysosomal system', *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 6(10), pp. a016857–a016857. doi: 10.1101/cshperspect.a016857.

Korolchuk, V. I., Saiki, S., Lichtenberg, M., Siddiqi, F. H., Roberts, E. A., Imarisio, S., Jahreiss, L., Sarkar, S., Futter, M., Menzies, F. M., O'Kane, C. J., Deretic, V. and Rubinsztein, D. C. (2011) 'Lysosomal positioning coordinates cellular nutrient responses.', *Nature cell biology*. Nature Publishing Group, 13(4), pp. 453–60. doi: 10.1038/ncb2204.

Laplante, M. and Sabatini, D. M. (2012) 'mTOR signaling in growth control and disease', *Cell*. Elsevier Inc., 149(2), pp. 274–293. doi: 10.1016/j.cell.2012.03.017.

Lee, Y., Nishizawa, T., Yamashita, K., Ishitani, R. and Nureki, O. (2015) 'Structural basis for the facilitative diffusion mechanism by SemiSWEET transporter', *Nature Communications*. Nature

Publishing Group, 6, p. 6112. doi: 10.1038/ncomms7112.

Li, W. and Reich, J. (2000) 'A Complete Enumeration and Classification of Two-Locus Disease', *Human Heredity*, 50, pp. 334–349. doi: 22939.

Lieberman, A. P., Puertollano, R., Raben, N., Slaugenhaupt, S., Walkley, S. U. and Ballabio, A. (2012) 'Autophagy in lysosomal storage disorders', *Autophagy*, 8(5), pp. 719–730. doi: 10.4161/auto.19469.

Lin, M. G. and Hurley, J. H. (2016) 'Structure and function of the ULK1 complex in autophagy', *Current Opinion in Cell Biology*, 39, pp. 61–68. doi: 10.1016/j.ceb.2016.02.010.

Liu, B., Du, H., Rutkowski, R., Gartner, A. and Wang, X. (2012) 'LAAT-1 Is the Lysosomal Lysine/Arginine Transporter That Maintains Amino Acid Homeostasis', *Science*, 337(6092), pp. 351–354. doi: 10.1126/science.1220281.

Linares, E., Barry, A. O. and André, B. (2015) 'The AP-3 adaptor complex mediates sorting of yeast and mammalian PQ-loop-family basic amino acid transporters to the vacuolar/lysosomal membrane', *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 5(October), p. 16665. doi: 10.1038/srep16665.

Long, X., Lin, Y., Ortiz-Vega, S., Yonezawa, K. and Avruch, J. (2005) 'Rheb binds and regulates the mTOR kinase', *Current Biology*. Elsevier, 15(8), pp. 702–713. doi: 10.1016/j.cub.2005.02.053.

Luzio, J. P., Hackmann, Y., Dieckmann, N. M. G. and Griffiths, G. M. (2014) 'The biogenesis of lysosomes and lysosome-related organelles', *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 6(9), pp. a016840–a016840. doi: 10.1101/cshperspect.a016840.

Luzio, J. P., Pryor, P. R. and Bright, N. A. (2007) 'Lysosomes: fusion and function.', *Nature reviews. Molecular cell biology*, 8(8), pp. 622–32. doi: 10.1038/nrm2217.

Manabe, K., Kawano-Kawada, M., Ikeda, K., Sekito, T. and Kakinuma, Y. (2016) 'Ypq3p-dependent histidine uptake by the vacuolar membrane vesicles of *Saccharomyces cerevisiae*', *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 80(6), pp. 1125–1130. doi: 10.1080/09168451.2016.1141041.

Martínez-Ruiz, A. and Lamas, S. (2007) 'Signalling by NO-induced protein S-nitrosylation and S-glutathionylation: Convergences and divergences', *Cardiovascular Research*. The Oxford University Press, pp. 220–228. doi: 10.1016/j.cardiores.2007.03.016.

Mattapallil, M. J., Wawrousek, E. F., Chan, C. C., Zhao, H., Roychoudhury, J., Ferguson, T. A. and Caspi, R. R. (2012) 'The Rd8 mutation of the Crb1 gene is present in vendor lines of C57BL/6N mice and embryonic stem cells, and confounds ocular induced mutant phenotypes.', *Investigative ophthalmology & visual science*, 53(6), pp. 2921–2927. doi: 10.1167/iovs.12-9662.

Mijaljica, D., Prescott, M. and Devenish, R. J. (2011) 'Microautophagy in mammalian cells: Revisiting a 40-year-old conundrum', *Autophagy*, 7(7), pp. 673–682. doi: 10.4161/auto.7.7.14733.

Mitchell, P. (1990) 'Osmochemistry of solute translocation', *Research in Microbiology*, 141(3), pp. 286–289. doi: 10.1016/0923-2508(90)90002-8.

Mizushima, N. and Levine, B. (2010) 'Autophagy in mammalian development and differentiation.', *Nature cell biology*. NIH Public Access, 12(9), pp. 823–30. doi: 10.1038/ncb0910-823.

Mizushima, N., Yamamoto, A., Matsui, M., Yoshimori, T. and Ohsumi, Y. (2004) 'In Vivo Analysis of Autophagy in Response to Nutrient Starvation Using Transgenic Mice Expressing a Fluorescent Autophagosome Marker', *Molecular Biology of the Cell*. American Society for Cell Biology, 15(3), pp. 1101–1111. doi: 10.1091/mbc.E03.

- Mleczak, A., Millar, S., Tooze, S. A., Olson, M. F. and Chan, E. Y. W. (2013) 'Regulation of autophagosome formation by Rho kinase', *Cellular Signalling*, 25(1), pp. 1–11. doi: 10.1016/j.cellsig.2012.09.010.
- Morris, S. M. (2006) 'Arginine: beyond protein.', *The American journal of clinical nutrition*, 83(2), p. 508S–512S. doi: 83/2/508S [pii].
- Mullock, B. M., Bright, N. A., Fearon, C. W., Gray, S. R. and Luzio, J. P. (1998) 'Fusion of lysosomes with late endosomes produces a hybrid organelle of intermediate density and is NSF dependent', *Journal of Cell Biology*. Rockefeller University Press, 140(3), pp. 591–601. doi: 10.1083/jcb.140.3.591.
- Napolitano, G. and Ballabio, A. (2016) 'TFEB at a glance', *Journal of Cell Science*. The Company of Biologists Ltd, 129(13), p. jcs.146365. doi: 10.1242/jcs.146365.
- Nevo, N., Chol, M., Bailleux, A., Kalatzis, V., Morisset, L., Devuyst, O., Gubler, M. C. and Antignac, C. (2010) 'Renal phenotype of the cystinosis mouse model is dependent upon genetic background', *Nephrology Dialysis Transplantation*, 25(4), pp. 1059–1066. doi: 10.1093/ndt/gfp553.
- Nixon, R. (2013) 'The role of autophagy in neurodegenerative disease', *Nature Medicine*. Nature Publishing Group, 19(8), pp. 983–997. doi: 10.1038/nm.3232.
- Novikoff, A., Beaufay, H. and Duve, C. de (1956) 'Electron Microscopy of Lysosome-Rich Fractions From Rat Liver', *The Journal of biophysical and biochemical cytology*, 2(4), pp. 179–184. doi: 10.1083/jcb.2.4.179.
- Pekarova, M. and Lojek, A. (2015) 'The crucial role of L-arginine in macrophage activation: What you need to know about it', *Life Sciences*, 137, pp. 44–48. doi: 10.1016/j.lfs.2015.07.012.
- Pisoni, R. L. and Lindley, E. R. (1992) 'Incorporation of ³²P Orthophosphate into Long Chains of Inorganic Polyphosphate within Lysosomes of Human Fibroblasts', pp. 3626–3631. Available at: <http://www.jbc.org/content/267/6/3626.full.pdf>.
- Pisoni, R. L., Thoene, J. G. and 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', *Journal of Biological Chemistry*, 260(8), pp. 4791–4698.
- Pisoni, R. L., Thoene, J. G., Lemons, R. M. and Christensen, H. N. (1987) 'Important differences in cationic amino acid transport by lysosomal system c and system y+ of the human fibroblast.', *The Journal of biological chemistry*, 262(31), pp. 15011–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3499437> \n <http://www.jbc.org/content/262/31/15011.short>.
- Platt, F. M., Boland, B. and van der Spoel, A. C. (2012) 'Lysosomal storage disorders: The cellular impact of lysosomal dysfunction', *Journal of Cell Biology*, 199(5), pp. 723–734. doi: 10.1083/jcb.201208152.
- Ravikumar, B., Sarkar, S., Davies, J. E., Futter, M., Garcia-Arencibia, M., Green-Thompson, Z. W., Jimenez-Sanchez, M., Korolchuk, V. I., Lichtenberg, M., Luo, S., Massey, D. C. O., Menzies, F. M., Moreau, K., Narayanan, U., Renna, M., Siddiqi, F. H., Underwood, B. R., Winslow, A. R. and Rubinsztein, D. C. (2010) 'Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology.', *Physiological reviews*. American Physiological Society, 90(4), pp. 1383–435. doi: 10.1152/physrev.00030.2009.
- Rebsamen, M., Pochini, L., Stasyk, T., de Araújo, M. E. G., Galluccio, M., Kandasamy, R. K., Snijder, B., Fauster, A., Rudashevskaya, E. L., Bruckner, M., Scorzoni, S., Filipek, P. A., Huber, K. V. M., Bigenzahn, J. W., Heinz, L. X., Kraft, C., Bennett, K. L., Indiveri, C., Huber, L. A. and Superti-Furga, G. (2015)

'SLC38A9 is a component of the lysosomal amino acid sensing machinery that controls mTORC1.', *Nature*. Nature Research, 519(7544), pp. 477–81. doi: 10.1038/nature14107.

Ruivo, R., Anne, C., Sagné, C. and Gasnier, B. (2009) 'Molecular and cellular basis of lysosomal transmembrane protein dysfunction', *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1793(4), pp. 636–649. doi: 10.1016/j.bbamcr.2008.12.008.

Ruivo, R., Bellenchi, G. C., Chen, X., Zifarelli, G., Sagné, C., Debacker, C., Pusch, M., Supplisson, S. and Gasnier, B. (2012) 'Mechanism of proton/substrate coupling in the heptahelical lysosomal transporter cystinosin', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(5), pp. E210–E217. doi: 10.1073/pnas.1115581109.

Sancak, Y., Bar-Peled, L., Zoncu, R., Markhard, A. L., Nada, S. and Sabatini, D. M. (2010) 'Ragulator-rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface and is necessary for its activation by amino acids', *Cell*. Elsevier Ltd, 141(2), pp. 290–303. doi: 10.1016/j.cell.2010.02.024.

Sancak, Y., Peterson, T. R., Shaul, Y. D., Lindquist, R. A., Thoreen, C. C., Bar-Peled, L. and Sabatini, D. M. (2008) 'The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1.', *Science (New York, N.Y.)*. American Association for the Advancement of Science, 320(5882), pp. 1496–501. doi: 10.1126/science.1157535.

Sardiello, Marco, Palimieri Michela, Di Ronza Alberto, Medina Diego Luis, V. M. et al. (2009) 'A Gene Network Regulating Lysosomal Biogenesis and Function', *Science*. American Association for the Advancement of Science, 325(July), pp. 473–477. doi: 10.1126/science.1174447.

Schröder, B. A., Wrocklage, C., Hasilik, A. and Saftig, P. (2010) 'The proteome of lysosomes', *Proteomics*, 10(22), pp. 4053–4076. doi: 10.1002/pmic.201000196.

Sekito, T., Nakamura, K., Manabe, K., Tone, J., Sato, Y., Murao, N., Kawano-Kawada, M. and Kakinuma, Y. (2014) 'Loss of ATP-dependent lysine uptake in the vacuolar membrane vesicles of *Saccharomyces cerevisiae* *ypq1* Δ mutant', *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 78(7), pp. 1199–1202. doi: 10.1080/09168451.2014.918489.

Settembre, C., Fraldi, A., Medina, D. L. and Ballabio, A. (2013) 'Signals from the lysosome: a control centre for cellular clearance and energy metabolism.', *Nature reviews. Molecular cell biology*. Nature Publishing Group, 14(5), pp. 283–96. doi: 10.1038/nrm3565.

Settembre, C., Zoncu, R., Medina, D. L., Vetrini, F., Erdin, S., Erdin, S., Huynh, T., Ferron, M., Karsenty, G., Vellard, M. C., Facchinetti, V., Sabatini, D. M. and Ballabio, A. (2012) 'A lysosome-to-nucleus signalling mechanism senses and regulates the lysosome via mTOR and TFEB.', *The EMBO journal*. Nature Publishing Group, 31(5), pp. 1095–108. doi: 10.1038/emboj.2012.32.

Shi, Y. (2013) 'Common folds and transport mechanisms of secondary active transporters', *Annu Rev Biophys*. Annual Reviews, 42(1), pp. 51–72. doi: 10.1146/annurev-biophys-083012-130429.

Simon, M. M., Greenaway, S., White, J. K., Fuchs, H., Gailus-Durner, V., Wells, S., Sorg, T., Wong, K., Bedu, E., Cartwright, E. J., Dacquin, R., Djebali, S., Estabel, J., Graw, J., Ingham, N. J., Jackson, I. J., Lengeling, A., Mandillo, S., Marvel, J., Meziane, H., Preitner, F., Puk, O., Roux, M., Adams, D. J., Atkins, S., Ayadi, A., Becker, L., Blake, A., Brooker, D., Cater, H., Champy, M.-F., Combe, R., Danecek, P., di Fenza, A., Gates, H., Gerdin, A.-K., Golini, E., Hancock, J. M., Hans, W., Hölter, S. M., Hough, T., Jurdic, P., Keane, T. M., Morgan, H., Müller, W., Neff, F., Nicholson, G., Pasche, B., Roberson, L.-A., Rozman, J., Sanderson, M., Santos, L., Selloum, M., Shannon, C., Southwell, A., Tocchini-Valentini, G. P., Vancollie, V. E., Westerberg, H., Wurst, W., Zi, M., Yalcin, B., Ramirez-Solis, R., Steel, K. P., Mallon, A.-M., de Angelis, M. H., Herault, Y. and Brown, S. D. M. (2013) 'A comparative phenotypic and genomic

- analysis of C57BL/6J and C57BL/6N mouse strains.’, *Genome biology*, 14(7), p. R82. doi: 10.1186/gb-2013-14-7-r82.
- Sun, L., Zeng, X., Yan, C., Sun, X., Gong, X., Rao, Y. and Yan, N. (2012) ‘Crystal structure of a bacterial homologue of glucose transporters GLUT1–4’, *Nature*, 490(7420), pp. 361–366. doi: 10.1038/nature11524.
- Tao, Y., Cheung, L. S., Li, S., Eom, J.-S., Chen, L.-Q., Xu, Y., Perry, K., Frommer, W. B. and Feng, L. (2015) ‘Structure of a eukaryotic SWEET transporter in a homotrimeric complex.’, *Nature*, 527(7577), pp. 259–63. doi: 10.1038/nature15391.
- Taylor, P. M., Kaur, S., Mackenzie, B. and Peter, G. J. (1996) ‘Amino-Acid-Dependent Modulation of Amino Acid Transport in *Xenopus Laevis* Oocytes’, *The Journal of experimental biology*, 931, pp. 923–931.
- Terman, a, Kurz, T., Gustafsson, B. and Brunk, U. T. (2006) ‘Lysosomal labilization.’, *IUBMB life*, 58(September), pp. 531–539. doi: 10.1080/15216540600904885.
- Thoene, J. G., Oshima, R. G. and Crawhall, J. C. (1976) ‘Intracellular cystine depletion by aminothiols in vitro and in vivo’, *Journal of Clinical Investigation*. American Society for Clinical Investigation, 58(1), pp. 180–189. doi: 10.1172/JCI108448.
- Tousoulis, D., Kampoli, A.-M., Tentolouris, C., Papageorgiou, N. and Stefanadis, C. (2012) ‘The role of nitric oxide on endothelial function.’, *Current vascular pharmacology*, 10(1), pp. 4–18. doi: 10.2174/157016112798829760.
- Ufer (2011) ‘The roles of glutathione peroxidases during embryo development’, *Frontiers in Molecular Neuroscience*. Frontiers Media SA, 4, p. 12. doi: 10.3389/fnmol.2011.00012.
- Verley, F. A., Grahn, D., Leslie, W. P. and Hamilton, K. F. (1967) ‘Sex ratio of mice as possible indicator of mutation rate for sex-linked lethals’, *Journal of Heredity*, 58(6), pp. 285–290.
- Wang, S., Tsun, Z.-Y., Wolfson, R. L., Shen, K., Wyant, G. A., Plovanich, M. E., Yuan, E. D., Jones, T. D., Chantranupong, L., Comb, W., Wang, T., Bar-Peled, L., Zoncu, R., Straub, C., Kim, C., Park, J., Sabatini, B. L. and Sabatini, D. M. (2015) ‘Lysosomal amino acid transporter SLC38A9 signals arginine sufficiency to mTORC1.’, *Science (New York, N.Y.)*. American Association for the Advancement of Science, 347(6218), pp. 188–94. doi: 10.1126/science.1257132.
- Wolfson, R. L., Chantranupong, L., Saxton, R. A., Shen, K., Scaria, S. M., Cantor, J. R. and Sabatini, D. M. (2015) ‘Sestrin2 is a leucine sensor for the mTORC1 pathway’, *Science*. American Association for the Advancement of Science, 351(6268), pp. 43–8. doi: 10.1126/science.aab2674.
- Wu, G. and Morris, S. M. (1998) ‘Arginine metabolism : nitric oxide and beyond’, *Biochem. J*, 336, pp. 1–17.
- Xu, H. and Ren, D. (2015) ‘Lysosomal physiology’, *Annu Rev Physiol*, 77(1), pp. 57–80. doi: 10.1146/annurev-physiol-021014-071649.
- Xu, Y., Tao, Y., Cheung, L. S., Fan, C., Chen, L.-Q., Xu, S., Perry, K., Frommer, W. B. and Feng, L. (2014) ‘Structures of bacterial homologues of SWEET transporters in two distinct conformations.’, *Nature*. Nature Publishing Group, 515(7527), pp. 448–452. doi: 10.1038/nature13670.
- Zdebik, A. A., Zifarelli, G., Bergsdorf, E. Y., Soliani, P., Scheel, O., Jentsch, T. J. and Pusch, M. (2008) ‘Determinants of anion-proton coupling in mammalian endosomal CLC proteins’, *Journal of Biological Chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 283(7), pp. 4219–4227. doi:

10.1074/jbc.M708368200.

Zhai, Y., Heijne, W. H. M., Smith, D. W. and Saier, M. H. (2001) 'Homologues of archaeal rhodopsins in plants, animals and fungi: Structural and functional predications for a putative fungal chaperone protein', *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1511(2), pp. 206–223. doi: 10.1016/S0005-2736(00)00389-8.

Zhang, J. (2013) 'Autophagy and mitophagy in cellular damage control', *Redox Biology*, 1(1), pp. 19–23. doi: 10.1016/j.redox.2012.11.008.

Zhang, X., Cheng, X., Yu, L., Yang, J., Calvo, R., Patnaik, S., Hu, X., Gao, Q., Yang, M., Lawas, M., Delling, M., Marugan, J., Ferrer, M. and Xu, H. (2016) 'MCOLN1 is a ROS sensor in lysosomes that regulates autophagy.', *Nature communications*. Nature Research, 7(May), p. 12109. doi: 10.1038/ncomms12109.

Zoncu, R. (2012) 'mTORC1 Senses Lysosomal Amino Acids Through an Inside-Out Mechanism That Requires the Vacuolar H⁺-ATPase Roberto Zoncu', *Science (New York, N.Y.)*. American Association for the Advancement of Science, 678(2011), pp. 678–83. doi: 10.1126/science.1207056.

Résumé – Abstract

Les lysosomes hydrolysent les macromolécules en composants élémentaires, exportés ensuite dans le cytoplasme par des transporteurs membranaires. Dans certaines maladies génétiques, comme la cystinose, l'export lysosomal est défectueux. D'autres transporteurs offrent alors une voie de secours pour évacuer le catabolite accumulé ; par exemple, le transporteur lysosomal d'acides aminés cationiques PQLC2, découvert en 2012, lors du traitement médicamenteux de la cystinose. L'objectif de ma thèse est : 1) de caractériser par des techniques électrophysiologiques le mécanisme de transport de PQLC2 et 2) d'étudier son rôle physiologique à l'échelle de l'organisme en produisant et caractérisant des souris « knock-out » (KO) pour le gène *Pqlc2*. Mes résultats montrent que l'arginine interagit de manière particulière avec PQLC2 (*trans*-stimulation sélective), ce qui pourrait moduler de manière spécifique l'arginine intralysosomale et, ainsi, moduler le régulateur maître du métabolisme cellulaire mTOR. Le modèle murin KO est viable et fertile, sans phénotype identifié. Cependant, son croisement avec un autre modèle murin révèle une interaction génétique forte (léthalité synthétique) avec une autre protéine lysosomale. Ces résultats suggèrent un rôle important de PQLC2 dans l'homéostasie des acides aminés intracellulaires, en particulier l'arginine, dont l'impact varie de manière extrême, de dispensable à vital, selon le contexte.

Mots clés : PQLC2, transporteur lysosomal, acides aminés, arginine, modèle murin, cystinose

Lysosomes hydrolyze macromolecules into building blocks that are exported into the cytosol through membrane transporters. Some inherited disorders, such as cystinosis, are caused by defective lysosomal export. However, other transporters can provide a salvage pathway to deplete the accumulated catabolite, such as the lysosomal cationic amino acids transporter PQLC2, identified in 2012, in the drug treatment of cystinosis. The aim of my thesis is: 1) to characterize the transport mechanism of PQLC2 by electrophysiological approaches and 2) to study its physiological role at the organismal level by producing and studying a knock-out (KO) mice for the gene *Pqlc2*. My results show that arginine interacts with PQLC2 in a specific, intricate manner (selective *trans*-stimulation), which could selectively modulate intralysosomal arginine and thereby modulate mTORC1, the master regulator of cell growth and metabolism. The KO mouse model is viable and fertile, without apparent phenotype. However, its crossing with another mouse model revealed a strong genetic interaction (synthetic lethality) with another lysosomal protein. These results suggest a critical role for PQLC2 in the homeostasis of intracellular amino acids, particularly arginine. Surprisingly, the impact of this role varies in an extreme manner, from dispensable to vital, depending on the context.

Key words : PQLC2, lysosomal transporter, amino acids, arginine, mouse model, cystinosis