



HAL
open science

Le poisson zèbre (*Danio rerio*) comme nouveau modèle d'étude de la CMA révèle un rôle inattendu de cette fonction dans la spermatogenèse.

Maxime Goguet

► To cite this version:

Maxime Goguet. Le poisson zèbre (*Danio rerio*) comme nouveau modèle d'étude de la CMA révèle un rôle inattendu de cette fonction dans la spermatogenèse.. Biochimie [q-bio.BM]. Université de Pau et des Pays de l'Adour, 2023. Français. NNT : 2023PAUU3059 . tel-04868205

HAL Id: tel-04868205

<https://theses.hal.science/tel-04868205v1>

Submitted on 6 Jan 2025

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

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

THESE

UNIVERSITE DE PAU ET DES PAYS DE L'ADOUR
Ecole doctorale 211—Sciences Exactes et leurs Applications (SEA)

Présentée et soutenue le 21 Novembre 2023 à Rennes

Par Maxime GOGUET

Pour obtenir le grade de docteur

De l'université de Pau et des Pays de l'Adour

Spécialité : Doctorat Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

Le poisson zèbre (*Danio rerio*) comme nouveau modèle d'étude de la CMA révèle un rôle inattendu de cette fonction dans la spermatogenèse

MEMBRES DU JURY

RAPPORTEURS

- Célia RAVEL Professeure des université/CHU & IRSET, Rennes
- Harald WODRICH (**Président**) Directeur de recherche/INSERM, Bordeaux

EXAMINATEUR

- Aude GAUTIER Chargée de recherche/CNRS, Caen

DIRECTEURS

- Iban SEILIEZ Directeur de recherche/INRAe, St Pée-sur-Nivelle
- Amaury HERPIN Directeur de recherche/INRAe, Rennes



Remerciements

Tout d'abord, je tenais à remercier tous les membres de mon jury, Pr Célia RAVEL, Dr Aude GAUTIER et Dr Harald WODRICH d'avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse.

Je tenais à remercier mes directeurs de thèse, Iban SEILIEZ et Amaury HERPIN de m'avoir accueilli pour mener à bien ce projet. Chacun à votre manière, vous m'avez guidé, conseillé et mis en avant sur ce sujet. Iban, tu as beau être loin de Rennes, tu étais toujours proche quand j'avais besoin de toi. Nos nombreuses réunions, tes conseils précieux et ton enthousiasme sans pareil ont été un réel carburant pour moi durant ces 3 années. Tu m'as donné ma chance alors que je n'y connaissais rien en poissons, mais ta confiance m'a réellement permis d'avancer. Pour tout cela, je te remercie sincèrement.

Amaury, je crois que, grâce à toi, je ne suis pas prêt d'oublier les premiers jours de cette thèse, ni ces 3 années d'ailleurs. A peine étais-je arrivé que tu me confiais déjà l'ensemble de l'armoire de poissons zèbre pour que je commence à les gérer. Cela m'a tout de suite mis dans le bain et donné la température de ces 3 années qui s'annonçaient chargées. Ta disponibilité, tes conseils et tes réponses à l'ensemble de mes questions m'ont permis de grandir scientifiquement, mais aussi personnellement. Les 3 premiers mois passés dans ton bureau (pour que tu gardes un œil sur moi) sont passés très vite tant l'ambiance générale et la bonne entente était de la partie. Je te remercie pour tout ce que tu as fait pour moi.

Je souhaite maintenant remercier Alexandra, sans qui j'aurais été bloqué de nombreuses fois, que cela soit au cours d'expériences ou même pour des problèmes administratifs. Dès les premiers instants, le courant est immédiatement passé entre nous et j'ai su que je pourrai compter sur toi à n'importe quel instant. D'ailleurs, je dois bien avouer que pour assurer certaines manips qui étaient plutôt importantes, je regardais souvent si tu étais dans le coin ou disponible car avec toi à mes côtés, je savais qu'on ne pouvait rien louper. Tu m'as aussi fait gagner un temps précieux à la fois dans la préparation de certains échantillons, mais aussi dans leurs analyses. Ces résultats, je les dois aussi à toi et toutes tes compétences, merci beaucoup.

J'aimerais également remercier l'ensemble de l'équipe des Installations Expérimentales sans qui rien de tout cela n'aurait été possible. Un grand merci en particulier à Pierre-Lô, qui m'a accompagné durant ces 3 ans, en prenant toujours le soin de m'expliquer tout ce que tu savais et que j'ignorais. J'espère que mes réponses et explications à tes questions étaient aussi claires pour moi que pour toi. Je te laisse les bichonner comme tu sais si bien le faire.

Je voudrais aussi remercier Jérôme M., pour avoir pris le temps de sortir des pavés de données génomiques et protéiques pour que je puisse « m'amuser » dessus. Florent, même si tu es tout récent dans ce laboratoire, ta bonne humeur et ton entrain font beaucoup bien au moral. Nathalie S., je te remercie pour nos nombreuses discussions sur la culture cellulaire, pour toutes tes astuces afin que mes cellules adhèrent même si au final, elles n'en ont fait qu'à leur tête. Jérôme B., merci beaucoup pour ton aide, qui va te sembler peut-être ridicule, mais qui m'a permis de gagner un temps monstre d'analyse d'images. Catherine, rien au début de cette thèse ne me faisait penser que j'allais avoir de (très) longues discussions avec toi sur les testicules ou même les spermatozoïdes. Ta porte était toujours ouverte et échanger avec toi était toujours un plaisir, et je te remercie pour cela. Jean-Jacques, un peu comme pour Catherine, rien ne présageait que nos routes allaient se croiser, mais c'est aussi ça la beauté de la science. Je te remercie pour ton expertise et tes conseils histologiques.

Je souhaiterais aussi remercier l'ensemble des collègues du laboratoire avec qui j'ai toujours passé un très bon moment. Tous vous nommer serait bien trop long, mais sachez que chacun à votre manière, vous m'avez permis de m'épanouir dans ce laboratoire durant 3 ans.

Je tenais aussi à remercier les collègues de St Pée-sur-Nivelle, sans qui ce projet n'aurait pu débiter, ni continuer. On ne s'est peut-être jamais rencontré en vrai, mais je sais au fond de moi que l'entente aurait été bonne. Des remerciements tout particuliers à Vincent V., qui nous a permis de lancer les lignées si précieuses et si extraordinaires. Tes maitrises techniques vont faire avancer le projet à pas de géants, j'en suis sûr. Je souhaitais aussi remercier Karine pour son investissement dans les extractions et dosages protéiques. Je remercie aussi Florian B. qui, de par son expertise, m'a permis de prendre du recul sur mes résultats et de toujours extraire les bonnes informations. Emilio, tu m'as tout de suite fait forte impression entre les résultats que tu obtenais rapidement et les perspectives que tu voulais leurs donner. Je suis certain que tu feras un scientifique hors pair. Enfin, et je dois bien terminer par eux, je remercie la petite bande de lurons que sont les doctorants de St Pée. A commencer par toi, mon « Némésis », Simon. Quasiment le même sujet, mais des routes quelques peu différentes. Passer du temps avec toi par Skype pour discuter de la CMA, mais aussi d'autres choses qui n'avaient rien à voir étaient toujours plaisant. Te voir pour la première fois à Bordeaux pour un congrès et boire une bière directe ensemble était le must ! Merci d'être toi et de m'avoir accompagné de loin durant ces 3 ans. Et pour tous les autres que j'ai croisé plus ou moins longtemps durant les JED, merci pour votre temps et votre bonne humeur, c'était vraiment nécessaire pour quelqu'un qui venait de passer 8h dans le train ! 😊

Bien évidemment, je garde un peu le meilleur pour la fin car sans les personnes que je vais nommer juste après, ces 3 ans n'auraient pas été les mêmes. Je voudrais tout d'abord commencer par mon acolyte, mon double de bureau, Manon. J'ai arrêté de compter le nombre de fois qu'on s'est marré dans ce bureau ou que nos discussions enchaînaient 3, 4 voire 5 sujets différents. Je te remercie surtout d'avoir accepté mes goûts musicaux assez changeants et spéciaux, passant de l'électro 140 BPM à Laurent VOULZY et sa chanson « le pouvoir des fleurs ». En parlant des personnes qui ne sont plus là, je me dois de remercier Aude et Antoine. Aude, Aude, Aude... Tellement de choses à dire que j'en perds mes mots. Tu es unique en ton genre et ta présence était une véritable bouffée d'air frais, voir même un ouragan. Ton fougue et ta franchise font de toi quelqu'un d'incroyable, reste comme tu es. Antoine, pour tes conseils concernant certaines manips mais aussi pour les moments de « pauses boissons » plus tranquille, tu as toujours su avoir le recul nécessaire sur de nombreux sujets et ta perspicacité m'a toujours étonné. D'ailleurs, cette partie de tennis que je t'ai proposé il y a maintenant 2 ans, je crois qu'il serait tant qu'on la fasse un jour ou l'autre quand même. Petite pensée aussi à Lucas qui ne lira jamais cette ligne car il bronze comme un pacha en Guadeloupe.

Après les absents, au tour des présents. Constance, je t'ai vu arriver dans ce laboratoire avec la timidité d'environ 50 personnes, mais tu as su te faire une place centrale dans cette équipe. Merci pour ta bonne humeur, ton sourire, mais surtout ta crédulité qui auront été pour moi d'un plaisir que je ne saurais décrire. Tu peux maintenant être tranquille dans le laboratoire, je ne serai plus là pour te faire peur, volontairement ou non ! Valentine, même si tu as su te faire discrète les premières semaines, tu m'as bluffé par ton honnêteté et ta loyauté. Avec toi, les choses sont dites et avec beaucoup de sincérité. Garde ta bonne humeur et ton enthousiasme. Marina, on est arrivé quasiment ensemble dans ce laboratoire et on s'est vu grandir au cours de ces 3 années. Ta curiosité et ta rigueur ont été les moteurs de l'ensemble de tes résultats, même si quelques injures (non compréhensives par nous) s'échappaient de temps en temps de ton bureau. Merci pour tes encouragements durant cette dernière ligne droite. Aline, je crois que je dois d'abord te remercier d'être encore en vie. Mes craquements auraient dû signer mon arrêt de mort bien avant que je puisse écrire ces phrases. Mais mis à part cela, je te remercie pour tes rires et ta sincérité qui m'ont toujours permis de garder le sourire. Sully, tes péripéties et tes révoltes contre le système étaient un délice à entendre et je crois bien que ça pourrait me manquer. Sarah, la petite dernière arrivée, merci pour toutes les histoires que tu as pu raconter de ta propre thèse, cela m'a permis de mieux visualiser la mienne et certainement de mieux la prendre en main.

Aussi, je dois remercier ceux sur qui je peux toujours compter, le BL. Nash, PAM, Flo, Loulou, Gaby, Paumard, Michou, Vico, Jojo, Thomazo. Merci pour les soirées, les rires et pour les futures belles choses qui nous attendent.

Je remercie aussi les personnes fondatrices du Prolo Land, Emil, Johan, Renaud et Maxime R. Nos vacances, nos parties de jeux-vidéos et surtout, les parties de Uno infini m'ont vraiment permis de souffler et reprendre des forces. J'ai été absent un moment mais je vais maintenant pouvoir être un peu plus disponible.

Je tenais aussi à remercier ma famille, pour leur soutien sans faille. Votre présence aura été motrice et réconfortante durant ces 3 ans.

Enfin, mes derniers remerciements vont vers celle qui m'accompagne depuis maintenant plus de 6 ans, et sans qui je n'aurais jamais pu accomplir ce projet. Au début, j'ai eu beaucoup de mal à te faire part de mes doutes et de mes quelques craintes, fondées ou non. Ton insistance mais surtout ta compassion et ton empathie m'auront finalement fait craquer. Mathilde, au-delà d'un simple soutien, tu étais l'épaule sur laquelle je pouvais me reposer à tout instant. Tu as pu me voir au mieux, comme au moins bien, mais tes encouragements, ton soutien, ta présence, ta gentillesse et tes rires ont toujours su me remonter le moral. J'espère qu'un jour je serai capable de te rendre autant que tu m'as donné.

Table des matières

Liste des figures	9
Introduction générale.....	13
Partie I : Autophagie.....	15
I. Différentes formes d'autophagie	15
II. Mécanismes de la CMA	18
1. Reconnaissance du motif KFERQ-like	18
a. Découverte du motif KFERQ.....	18
b. Composition du motif.....	19
2. Formation d'un complexe avec HSC70 et ses co-chaperonnes.....	20
3. Encrage du substrat à la membrane lysosomale.....	22
4. Formation du complexe multimérique de LAMP2A.....	22
5. Internalisation et dégradation du substrat	23
III. Mécanisme de régulation de la CMA.....	23
1. Régulation de LAMP2A.....	23
a. Régulation transcriptionnelle de LAMP2A	23
b. Transport de LAMP2A aux lysosomes	24
c. Stabilité de LAMP2A au niveau de la membrane lysosomale	24
d. Dégradation et recyclage de LAMP2A.....	25
IV. Rôle physiologique de la CMA	26
1. Réponse à un stress.....	26
a. Stress nutritif.....	26
b. Stress oxydatif	26
2. Régulation de processus cellulaires	27
a. Contrôle du métabolisme hépatique	27
b. Contrôle de la différenciation adipocytaire	28
c. Contrôle de la réponse immunitaire	28
d. Contrôle de la réparation de l'ADN et du cycle cellulaire	29
e. Contrôle de l'horloge circadienne	29
V. Pathologies associées	30
1. Maladies neurodégénératives.....	30
2. Cancers	31
3. Maladies métaboliques	33
4. Autres pathologies et vieillissement	33
VI. Histoire évolutive de la CMA.....	34

1.	Découverte du gène <i>Lamp2</i> chez les poissons.....	34
2.	Évolution des domaines et de la structure de LAMP2A.....	36
a.	Le motif GYXXF.....	36
b.	Les acides aminés chargés positivement.....	38
c.	Domaines LAMP.....	38
d.	Glycines dans la région transmembranaire.....	39
3.	Conservation de la fonction CMA chez le Médaka.....	40
	PARTIE II : Le poisson zèbre.....	43
I.	Un modèle d'étude incontournable.....	43
1.	Un génome entièrement séquencé.....	43
2.	Une facilité de manipulation génétique.....	43
3.	Des embryons transparents.....	45
4.	Une reproduction et une croissance rapide.....	46
5.	Le poisson zèbre comme miroir de l'évolution.....	46
II.	L'utilisation du poisson zèbre dans la recherche scientifique.....	47
1.	Modélisation de maladies génétiques et des cancers.....	47
2.	Les xénogreffes : une alternative efficace pour l'étude des pathologies humaines.....	48
3.	Criblage à haut débit de composés chimiques.....	49
III.	Poisson zèbre et autophagie.....	49
	Partie III : Spermatogenèse.....	51
I.	La spermatogenèse.....	51
1.	Différences structurelles entre amniotes et anamniotes.....	51
2.	Les différentes étapes de la spermatogenèse.....	52
a.	Stades spermatogonies.....	53
b.	Stades méiotiques.....	55
c.	Stades post-méiotiques.....	56
II.	Les cellules de Sertoli, acteur majeur de la spermatogenèse.....	57
1.	Généralités.....	57
2.	Les cellules de Sertoli et le déterminisme sexuel.....	57
3.	Une barrière indispensable au cours de la spermatogenèse : la BTB.....	59
4.	Les relations entre les cellules de Sertoli et les cellules germinales.....	60
a.	Rôle dans l'auto-renouvellement des Cellules Souches Spermatogoniales (CSS) et dans l'induction de la spermatogenèse.....	60
b.	Le rôle des cellules de Sertoli ne se cantonne pas à la spermatogenèse.....	60
5.	Relations avec d'autres types cellulaires.....	61

a.	Cellules de Leydig	61
b.	Cellules myoïdes périvitubulaires (PMC)	62
III.	Régulation de la spermatogenèse	62
1.	Hormonale.....	62
a.	Gonadotrophines.....	62
b.	Androgènes	63
c.	Œstrogènes.....	63
2.	Le cytosquelette : lorsque la structure impacte la fonction	64
3.	Importance métabolique et rôles des mitochondries.....	65
a.	L'apport d'énergie des cellules de Sertoli	65
b.	Régulations métaboliques	66
4.	Autophagie	68
a.	Rôle de la mitophagie.....	68
b.	Rôle de la réticulophagie.....	70
c.	Rôle de la lipophagie	70
	Objectifs	75
	Publication 1:.....	79
	Diving into the Evolutionary History of HSC70-Linked Selective Autophagy Pathways: Endosomal Microautophagy and Chaperone-Mediated Autophagy	79
	Publication 2:.....	99
	Chaperone-mediated autophagy regulates spermatogenesis: new insights from zebrafish	99
	Discussion générale	149
I.	Histoire évolutive de la CMA et l'eMi.....	149
1.	Un même motif pour 2 fonctions différentes ?	149
2.	Une fonction CMA-like chez l'ensemble des téléostéens ?	150
3.	Evolution du motif KFERQ-like	151
II.	Présence d'une activité CMA chez le poisson zèbre.....	153
1.	Une activité CMA-like identique à la fonction décrite chez les mammifères	153
2.	Un nouveau modèle pour étudier la CMA	154
III.	Rôle de la CMA dans la spermatogenèse	155
1.	La piste des mitochondries.....	155
a.	Mitochondries dysfonctionnelles dans les spermatozoïdes des poissons Lamp2A-KO	155
b.	Mitochondries dysfonctionnelles dans les testicules des poissons Lamp2A-KO	156
2.	La piste du cytosquelette	157
a.	Désorganisation du cytosquelette dans les testicules des poissons Lamp2A-KO ?	157

b. Désorganisation du cytosquelette dans les spermatozoïdes des poissons Lamp2A-KO ?..	159
3. Baisse de la réaction de phase aiguë.....	159
Conclusion générale	163
ABSTRACT	188

Liste des figures

Figure 1 : Principales voies de l'autophagie : la macroautophagie, la microautophagie et l'autophagie médiée par les protéines chaperonnes	15
Figure 2 : Différentes étapes de la macroautophagie	16
Figure 3 : Schéma de la microautophagie et de la microautophagie endosomale.....	17
Figure 4 : Description de la construction d'un motif KFERQ-like	19
Figure 5 : Différentes étapes de la CMA.....	20
Figure 6 : Schéma de la structure du gène <i>Lamp2</i> humain	21
Figure 7 : Schéma de l'histoire évolutive du gène <i>LAMP</i>	35
Figure 8 : Conservation de la synténie du gène <i>Lamp2</i> au cours de l'évolution.....	36
Figure 9 : Alignement des séquences protéiques de la queue cytosolique de LAMP2A entre différents vertébrés	37
Figure 10 : Prédiction de la structure 3D de la protéine LAMP2A chez l'homme et le poisson zèbre	38
Figure 11 : Alignement des séquences de la protéine LAMP2A entre différentes espèces	39
Figure 12 : Protocole expérimental pour quantifier l'activité CMA chez le poisson zèbre <i>in vitro</i>	41
Figure 13 : Visualisation du développement embryonnaire du poisson zèbre.....	44
Figure 14 : Schéma du développement du poisson zèbre, de la fécondation jusqu'à l'âge adulte	45
Figure 15: Comparaison de la structure des testicules entre anamniote et amniote au cours de la spermatogenèse	51
Figure 16 : Différentes étapes de la spermatogenèse	52
Figure 17 : Représentation schématique de la spermatogenèse	53
Figure 18 : Schématisation de la spermatogenèse chez la truite et le poisson zèbre	54
Figure 19 : Représentation schématique des 5 étapes de la prophase méiotique	55
Figure 20 : Schéma de la structure d'un axonème de flagelle de mammifère	56
Figure 21 : Voies impliquées dans la régulation du déterminisme sexuel chez la souris	58
Figure 22 : La barrière hémato-testiculaire sépare 2 environnements différents dans des cellules de Sertoli de mammifères.....	59
Figure 23 : Illustration schématique du métabolisme de la cellule de Sertoli.....	66
Figure 24 : Composition du motif KFERQ-like canonique entre différentes espèces.....	151
Figure 25 : Conservation de motifs KFERQ-like bona fide entre espèces	152
Figure 26 : Analyse protéomique quantitative des testicules de poisson zèbre LAMP2A-KO vs WT.....	158

INTRODUCTION

Introduction générale

L'autophagie participe à de nombreux processus cellulaires cruciaux en recyclant et en éliminant les composants cellulaires endommagés, les protéines considérées comme délétères et les organites non fonctionnels via leur transport vers les lysosomes. De par ces différents processus, elle joue un rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie cellulaire, la régulation du métabolisme, la réponse au stress et l'immunité. De nombreuses études ont pu montrer son implication en réponse à des changements environnementaux et/ou en cas de stress physiologiques. Chez l'homme, lorsque le processus d'autophagie est altéré, les cellules peuvent accumuler des déchets et des protéines toxiques, ce qui peut contribuer au développement de diverses maladies, notamment les maladies neurodégénératives telles que Parkinson et Alzheimer, les maladies cardiovasculaires, les maladies métaboliques ou encore le cancer.

Depuis la découverte de l'autophagie au début des années 1960 par Christian De Duve et plus récemment de l'Autophagie médiée par les protéines chaperonnes (plus communément appelée CMA pour Chaperone-Mediated Autophagy) à la fin des années 1980 par Fred J Dice, le nombre de recherches sur les mécanismes régissant les différents sous-types d'autophagie ont explosé. Toutefois, de nombreuses interrogations subsistent sur les mécanismes fins de leur activation ainsi que sur leurs rôles respectifs dans le contrôle des principales fonctions cellulaires et tissulaires.

Récemment, des preuves fonctionnelles de l'existence d'une activité CMA ont été apportés chez les poissons (Lescat et al., 2020), apportant des changements conceptuels importants dans notre compréhension de l'histoire évolutive de la CMA, et ouvrant de nouvelles perspectives en recherche, notamment en permettant l'utilisation de modèles animaux complémentaires, tels que le poisson zèbre ou le médaka (espèces déjà largement utilisées en recherche biomédicale), pour mieux comprendre les mécanismes régissant la CMA.

Dans ce contexte, le travail effectué au cours de ma thèse s'est articulé en deux volets principaux. Le premier a consisté à faire une synthèse des connaissances actuelles sur les différents facteurs impliqués dans la CMA ainsi que dans un autre sous-type d'autophagie sélective, considéré comme une voie alternative à la CMA et appelé eMI (pour endosomal Microautophagy). Il s'agissait de retracer l'histoire évolutive de ces deux fonctions, mais également de déterminer dans quelle mesure des fluctuations entre espèces au niveau de la séquence d'un facteur clé de la CMA connu sous le nom de LAMP2A (lysosome-associated membrane protein 2A) pourraient impacter le rôle de cette fonction. Le second objectif était de déterminer la présence d'une activité CMA chez le poisson zèbre, une espèce reconnue comme étant un modèle animal incontournable dans la recherche scientifique. L'enjeu ici était de déterminer dans quelle mesure cette espèce peut être utilisée pour améliorer nos connaissances sur la régulation et le rôle de la CMA. Les données obtenues sont allées bien au-delà de nos attentes initiales et ont permis de dévoiler un rôle de la CMA, jusque-là inconnu, dans la spermatogenèse.

Partie I : Autophagie

I. Différentes formes d'autophagie

L'autophagie, qui provient de la combinaison du mot « auto » pour soi-même et de « phagie » pour manger, correspond à un processus catabolique lysosomal permettant la dégradation des macromolécules cytoplasmiques, d'organites ou encore de différents pathogènes au sein même de la cellule.

Chez les mammifères, l'autophagie est décrite sous 3 principales voies : la macroautophagie, la microautophagie et l'autophagie médiée par les protéines chaperonnes (plus communément

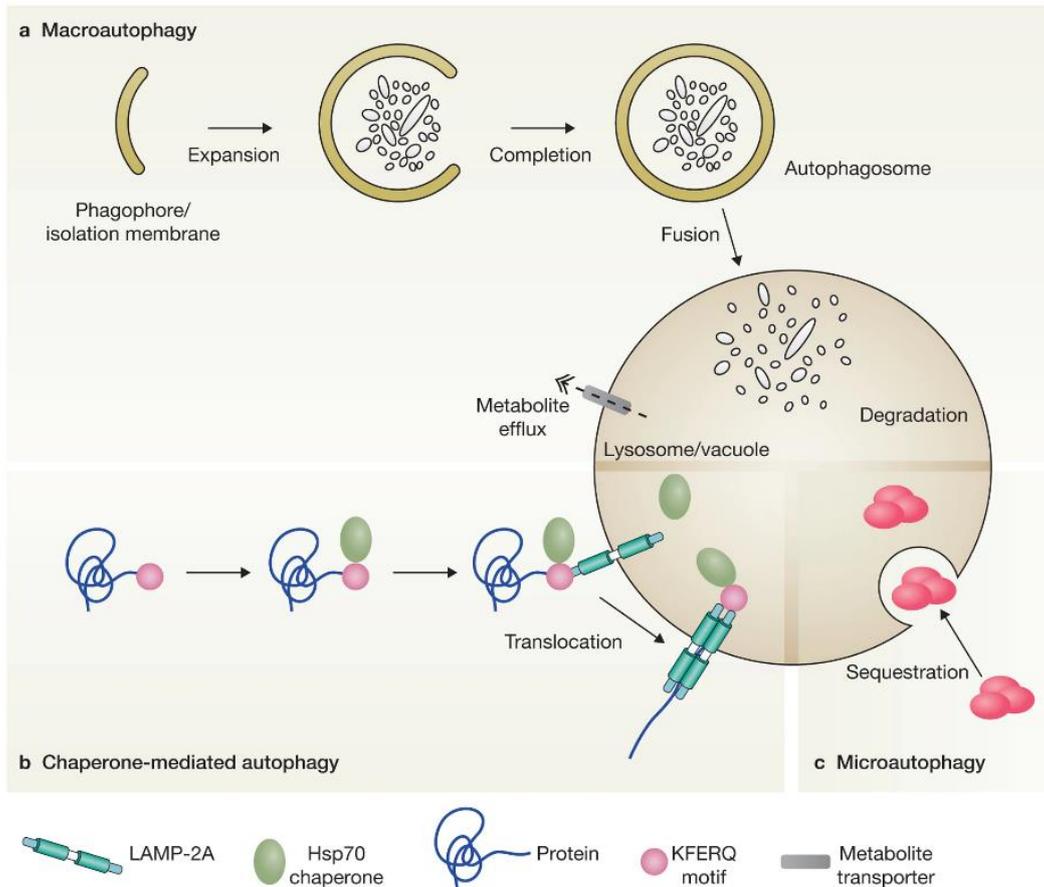


Figure 1 : Principales voies de l'autophagie : la macroautophagie, la microautophagie et l'autophagie médiée par les protéines chaperonnes (Boya et al, 2013).

a. L'initiation de la macroautophagie s'effectue par la formation d'un phagophore (ou isolation membrane), qui va ensuite s'allonger jusqu'à former une vésicule à double membrane, appelée autophagosome, permettant la séquestration des substrats à dégrader. L'autophagosome va ensuite fusionner avec un lysosome, libérant ainsi les substrats dans la lumière lysosomale où ils seront dégradés.

b. Les protéines arborant un motif KFERQ-like vont être reconnues par un complexe de protéines chaperonnes mené par HSC70. Ce cargo va ensuite être transporté au niveau de la membrane lysosomale où il va se lier avec la protéine LAMP2A. Après multimérisation de LAMP2A, la protéine cible va être dénaturée, puis transloquée dans la lumière du lysosome avant d'être dégradée.

c. Au cours de la microautophagie dite par « bulk », des amas de macromolécules vont être internalisés dans le lysosome pour être dégradés.

appelée CMA pour Chaperone-Mediated Autophagy) (Fig. 1). Même si la finalité de ces différentes formes d'autophagies est la même, c'est-à-dire séquestrer un substrat cellulaire jusqu'à sa dégradation dans des vésicules lysosomales et leur recyclage, elles diffèrent néanmoins par les mécanismes impliqués dans la prise en charge de substrats et leurs régulations.

Dans le cas de la macroautophagie, voie la plus étudiée lorsque l'on parle d'autophagie, 3 grandes étapes ont été identifiées : l'initiation, la fusion et la dégradation (Fig. 2). De nombreux facteurs peuvent être à l'origine de l'initiation de la macroautophagie tels qu'une baisse de l'apport énergétique ou encore un manque de nutriments. La première étape commence par la formation d'une membrane lipidique pouvant provenir de nombreuses sources, comme du réticulum endoplasmique, de l'appareil de Golgi ou encore de la membrane plasmique elle-même. La formation et l'élongation de cette membrane est initiée et finement orchestrée par différentes protéines et complexes, que nous ne détaillerons pas dans ce manuscrit, et qui conduit *in fine* à la formation d'un autophagosome (une vésicule à double membrane contenant le substrat à dégrader). La deuxième étape consiste ensuite à la fusion entre cet autophagosome et un lysosome, qui va apporter l'ensemble des enzymes nécessaires à la dégradation des protéines séquestrées. Pour finir, la dernière étape consiste en la dégradation à proprement parlé de ces substrats.

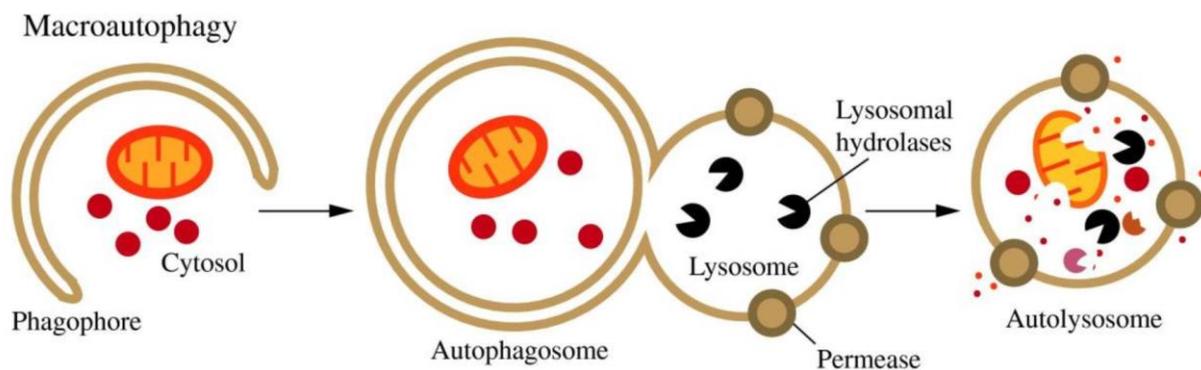


Figure 2 : Différentes étapes de la macroautophagie (Parzych & Klionsky, 2014)

Dans le cas de la microautophagie dite non sélective, les substrats (protéines, gouttelettes lipidiques,...) sont directement internalisés au sein de la lumière lysosomale ou des endosomes tardifs via l'invagination de la membrane lysosomale ou endosomale (Fig. 3.1). Cette invagination peut s'effectuer de 2 manières : (i) avec la formation d'une protubérance lysosomale, ou (ii) avec une invagination de la membrane lysosomale. Cependant, les mécanismes mis en œuvre au sein de ces différentes microautophagies restent incertains. Pour des petites particules et des constituants cytosoliques (par exemple des protéines), la membrane lysosomale va former des invaginations pour internaliser ces composants cellulaires. Lorsque des structures relativement grandes (comme des mitochondries) ou un groupe d'organites sont absorbés par microautophagie, des interactions entre la membrane lysosomale et le substrat sont impliquées dans l'encerclement du composant cellulaire ciblé destiné à la dégradation (Mijaljica et al., 2011).

Chez la levure, 3 formes principales de microautophagie sélective ont été décrites. Il s'agit de la micropexophagie (Bellu et al., 2001), de la « piecemeal microautophagy » (Harding et al., 1995) et de la micromitophagie (Kissová et al., 2007) qui assurent, respectivement, la dégradation des peroxisomes, du noyau et des mitochondries par microautophagie. Toutefois,

la microautophagie régulerait également la taille des lysosomes en consommant l'excès de membrane produite lors de la macroautophagie (Todde et al., 2009). Elle interviendrait aussi dans l'intégration du glycogène dans le lysosome pour sa dégradation (Takikita et al., 2009). Enfin, récemment Ranjit Sahu et ses collaborateurs, ont mis en évidence, dans des cellules dendritiques de souris, un processus d'internalisation de certaines protéines par invagination de la membrane endosomale (Sahu et al., 2011). Ce processus est aujourd'hui appelé microautophagie-endosomale (ou eMI pour endosomal Microautophagy) (Fig. 3.2).

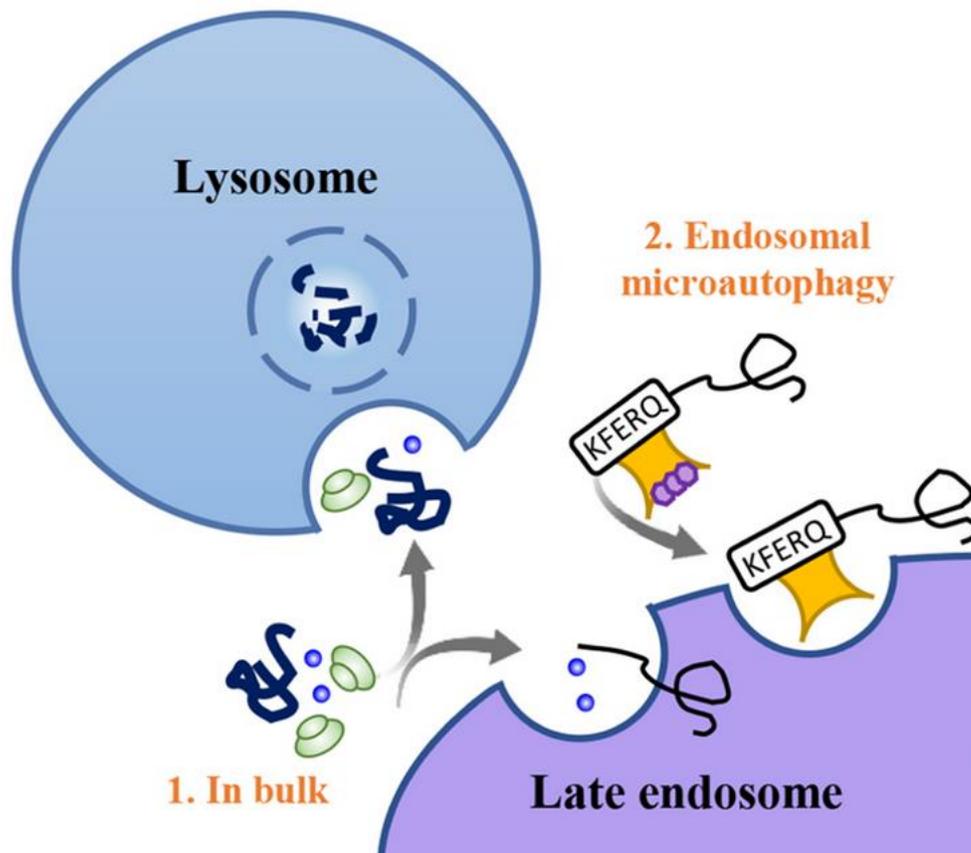


Figure 3 : Schéma de la microautophagie (1) et de la microautophagie endosomale (2)

1. Au cours de la microautophagie dite non sélective (ou « in bulk »), les constituants cytoplasmiques vont être internalisés dans les lysosomes ou endosomes tardifs par invagination membranaire.

2. Dans le cas de l'eMi, les protéines prises en charge doivent arborer un motif KFERQ-like pour être reconnues par le complexe de protéines chaperonnes. Elles seront ensuite conduites au niveau de la membrane endosomale où elles seront reconnues par les protéines ESCRT avant d'être internalisées.

Brièvement, au cours de ce processus, les protéines cytosoliques contenant la séquence consensus KFERQ (Lys-Phe-Glu-Arg-Gln) sont reconnues par la protéine chaperonne « Heat Shock-Cognate Protein of 71 kDa » (HSC70, également connu sous le nom de HSPA8). Une fois le complexe substrat/chaperonne formé, il va s'amarrer à la membrane endosomale par liaison spécifique à un lipide membranaire, la Phosphatidylserine (PS). Ensuite, des protéines du complexe ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport) vont permettre l'internalisation du substrat dans des vésicules au sein de l'endosome, qui deviendra un corps multi-vésiculaire (aussi appelé MVB pour Multi Vesicular Bodies). Enfin, la dégradation du

substrat aura lieu soit directement dans les endosomes tardifs/MVB, soit après la fusion entre ces endosomes tardifs avec les lysosomes.

La troisième principale voie autophagique correspond à la CMA, qui fait l'objet de la présente thèse. Dans les sections qui vont suivre, nous aborderons donc plus en détails les étapes clés pour sa mise en place et son fonctionnement ainsi que son importance dans la régulation de multiples processus cellulaires. Nous nous arrêterons aussi sur les conséquences possibles lors de l'absence ou d'un dérèglement de cette voie. Nous nous pencherons ensuite sur le lien entre la CMA et les autres voies du catabolisme protéique. Pour finir, nous retracerons l'histoire évolutive de cette voie.

II. Mécanismes de la CMA

Contrairement aux autres voies décrites précédemment, la séquestration du substrat ne nécessite pas la formation d'une vésicule autophagique. Toutefois, comme pour l'eMi, la CMA cible spécifiquement des protéines cytoplasmiques pourvues d'un motif KFERQ-like. Elles se décomposent en 4 grandes étapes distinctes que nous allons détailler dans cette section.

1. Reconnaissance du motif KFERQ-like

La CMA commence par la reconnaissance des protéines qui possèdent un motif KFERQ-like par la protéine chaperonne HSC70.

a. Découverte du motif KFERQ

La mise en évidence de ce processus autophagique a vu le jour pour la première fois lors d'une étude menée par l'équipe de Fred J Dice, qui démontra l'existence d'une dégradation sélective des protéines par les lysosomes (Dice et al., 1987). Ils ont ainsi remarqué que la Ribonucléase A (RNase A) était dégradée significativement plus rapidement que d'autres protéines lorsque les cellules étaient soumises à un stress nutritif. Ils ont ensuite démontré que la cinétique de dégradation de cette protéine était intrinsèquement liée à la présence d'un motif penta-peptidique particulier dans sa séquence, le motif KFERQ (Dice et al., 1987).

Après avoir mis en lumière que ce motif était nécessaire et suffisant à la prise en charge de protéines par le lysosome, Fred J Dice s'interrogea sur la redondance de ce motif dans d'autres protéines (Dice et al., 1987). L'analyse in-silico des séquences protéiques disponibles montra que seule la RNase A possédait exactement ce motif. Cependant, l'utilisation d'anticorps contre ce motif révéla la présence de nombreuses protéines pourvues de ce motif (entre 20 et 35% des protéines cytoplasmiques du protéome humain), dont la plupart étaient, elles aussi, dégradées de manière plus rapide que les protéines ne possédant pas ce motif en condition de stress nutritionnel. Ils arrivèrent à la conclusion que l'exactitude du motif n'était pas la clé de leur prise en charge, mais que c'était plutôt les propriétés physico-chimiques du motif qui étaient importantes (Dice et al., 1987).

b. Composition du motif

En sachant maintenant que le motif doit respecter non plus une séquence particulière mais une composition respectant des propriétés spécifiques, il a été proposé que le motif canonique devait être composé d'un ou de deux acides aminés basiques (L ou K), d'un ou de deux acides aminés hydrophobes (L, F, I ou V), d'un acide aminé acide (D ou E) et enfin, qu'il devait être flanqué d'une glutamine (G) (quel que soit le côté) (Fig. 4) (Dice, 1990).

En outre, certaines modifications post-traductionnelles (phosphorylation ou acétylation) d'une séquence ne contenant pas le motif canonique exacte semblent permettre la reconnaissance par HSC70 de ce motif, augmentant ainsi le nombre de protéines potentiellement candidates à la prise en charge par la CMA (Lv et al., 2011; Thompson et al., 2009). La phosphorylation des résidus S, T ou Y permet ainsi de compléter un motif contenant 4 des résidus du motif canonique mais dans lequel il manque le résidu chargé négativement. Une transformation post-traductionnelle du motif par acétylation peut également avoir lieu lorsqu'une lysine (K) remplace la glutamine (Q) (Fig. 4).

Enfin, des modifications post-traductionnelles peuvent aussi avoir lieu en dehors du motif (comme l'ubiquitination, la sumoylation ou l'acétylation) et ont la capacité de moduler la prise en charge de ces protéines arborant un motif canonique par la CMA (Kiffin et al., 2004). Cette modulation peut permettre à la fois un accès au motif pour la protéine chaperonne comme une restriction de son accès.

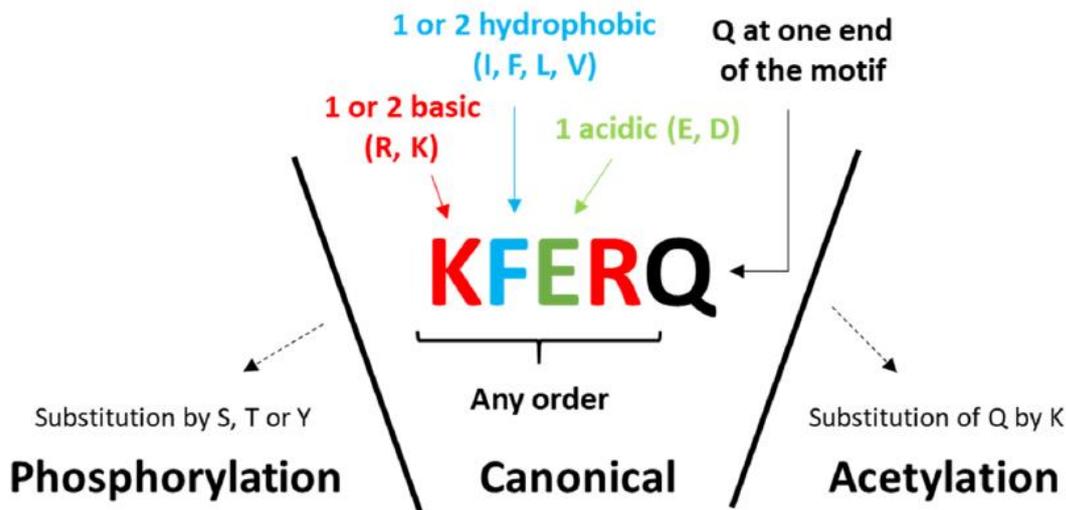


Figure 4 : Description de la construction d'un motif KFERQ-like

L'ensemble de ces données suggère que le nombre de protéines pouvant être ciblées par la CMA puisse être bien plus élevé que celui initialement suspecté, qui n'incluait que les protéines cytosoliques pourvues d'un domaine canonique KFERQ. En ce sens, une récente analyse à grande échelle du protéome humain a montré que près de 46% des protéines contient le motif canonique KFERQ et environ 30% un motif putatif (modifications par acétylations ou phosphorylations), suggérant que le pourcentage de protéines potentiellement ciblées par la CMA est de 76% (Kirchner et al., 2019). Les enrichissements par Gene Ontology montrent que ces protéines sont impliquées dans de nombreux processus biologiques, comme dans le métabolisme cellulaire, le cycle cellulaire, l'expression des gènes, la mort cellulaire ou encore

le métabolisme des acides nucléiques et la transcription (Kirchner et al., 2019). Toutefois, actuellement seule une cinquantaine de substrats de la CMA ont été validés expérimentalement (Kaushik and Cuervo, 2018).

Enfin, notons que ce motif KFERQ-like est bien conservé au cours de l'évolution et est globalement retrouvé dans les mêmes proportions dans d'autres espèces telles que la souris (*Mus musculus*), la drosophile (*Drosophila melanogaster*) et la levure (*Saccharomyces cerevisiae*). Cependant, ils ont observé une légère tendance à la conservation du motif canonique chez la souris et la drosophile qui sont capables d'effectuer respectivement la CMA et l'eMI ou juste l'eMI (Kirchner et al., 2019).

2. Formation d'un complexe avec HSC70 et ses co-chaperonnes

La protéine chaperonne HSC70 fait partie de la grande famille des « Heat Shock Protein 70 kDa » (HSP70) et est constitutivement exprimée. Elle est principalement retrouvée au niveau du cytoplasme, mais peut aussi se retrouver dans de nombreux compartiments cellulaires, comme au niveau du noyau, de la membrane cytoplasmique ou encore au cœur des lysosomes. Cette protéine chaperonne est impliqué dans de multiples processus cellulaires, comprenant le maintien de l'homéostasie protéique (repliement des protéines, assemblage), la translocation protéique ou la reconnaissance des substrats pour leur dégradation via les endosomes ou les lysosomes.

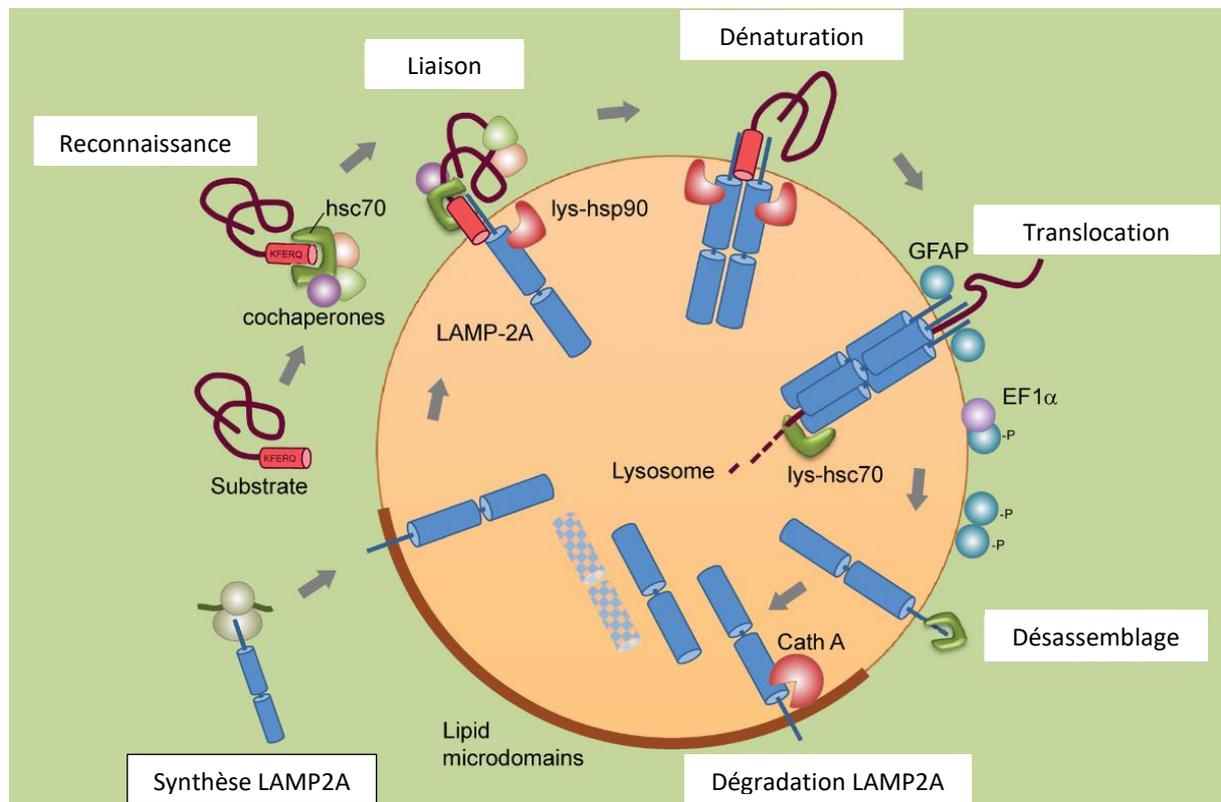


Figure 5 : Différentes étapes de la CMA (Adaptée de Kaushik et al, 2016)

Après avoir la prise en charge du substrat, le cargo protéique se fixe à la membrane lysosomale et se lie avec Lamp2a. Après sa multimérisation, le substrat sera dénaturé puis transloqué dans le lysosome pour y être dégradé.

3. Encrage du substrat à la membrane lysosomale

Bien que la présence de HSC70 soit nécessaire à la reconnaissance des substrats à dégrader, sa présence seule ne pouvait expliquer la fixation de ce complexe à la membrane lysosomale et la dégradation *in fine* du substrat. Comme ont pu nous montrer l'équipe de Cuervo et Dice, il existe à la membrane lysosomale un récepteur spécifique qui permet la liaison entre le complexe HSC70-substrat et le lysosome (Cuervo and Dice, 1996). Cette protéine est aujourd'hui communément appelée « Lysosome-Associated Membrane Protein 2A » (LAMP2A).

LAMP2A est une protéine qui provient de l'épissage alternatif du gène *Lamp2*, codant pour LAMP2A, LAMP2B et LAMP2C (Gough et al., 1995). Même si ces 3 protéines partagent tous un même domaine luminal, elles se différencient par leurs parties transmembranaires et cytosoliques (Fig. 6A). LAMP2A est le seul des 3 isoformes nécessaires pour la mise en place de la CMA (A. M. Cuervo and Dice, 2000). La présence de 3 à 4 résidus positivement chargés dans la queue cytosolique de LAMP2A est nécessaire pour permettre la liaison avec le complexe HSC70-substrat (A. M. Cuervo and Dice, 2000). Toutefois, bien que cette protéine soit aujourd'hui considérée comme le facteur limitant de l'activité de la CMA, son mode d'action comporte encore quelques zones d'ombre. Selon l'idée actuellement admise, suite à la reconnaissance des protéines à domaine KFERQ par HSC70 et les co-chaperonnes associées, le complexe ainsi formé est transporté à la membrane lysosomale où il va être reconnu par la queue cytosolique de LAMP2A en état monomérique (Cuervo and Dice, 2000; Cuervo and Dice, 1996).

Cette liaison reste cependant dépendante uniquement de HSC70 et non de la présence du motif KFERQ (Cuervo and Dice, 1996). Récemment, Ikami et al. ont mis en évidence chez la souris l'interaction directe entre HSC70 et deux des quatre acides aminés chargés positivement (K406 et R407) situés dans la queue cytosolique de LAMP2A (Ikami et al., 2022). Ces données confirment les conclusions tirées de l'étude, par résonance magnétique nucléaire, des interactions entre LAMP2A et HSC70, mettant en évidence une interaction entre le domaine de liaison au substrat de HSC70 et les résidus K401 et H402 chargés positivement de LAMP2A humaine (correspondant respectivement à K406 et R407 de LAMP2A de la souris) (Rout et al., 2014).

L'ensemble de ces résultats confirme ainsi l'affinité intrinsèque de HSC70 pour la queue cytoplasmique de LAMP2A et le rôle important des deux résidus chargés positivement dans cette affinité (Fig. 6)

4. Formation du complexe multimérique de LAMP2A

Après la reconnaissance et la liaison du complexe HSC70-substrat avec la protéine LAMP2A monomérique, celle-ci va alors se multimériser pour former un complexe homotrimérique, permettant une meilleure affinité avec le substrat (Fig. 5) (Bandyopadhyay et al., 2008). Cette multimérisation est régulée à la fois par la présence de HSP90, mais aussi par la présence d'un motif particulier situé dans la partie transmembranaire de LAMP2A, le motif GXXXG (Bandyopadhyay et al., 2008; Russ and Engelman, 2000). Les travaux de Bandyopadhyay et al en 2008 ont notamment mis en évidence que des mutations au sein de cette séquence avait un impact significatif dans la multimérisation de LAMP2A, même si elles

n'entraînaient aucune conséquence dans la stabilité de cette protéine ou son insertion dans la membrane lysosomale. Chez les mammifères, la protéine LAMP2A présente 2 domaines (domaines N et C) fortement conservés situés dans la partie luminale des lysosomes, les domaines LAMPs. Très peu de données sont disponibles sur leurs rôles, néanmoins une étude récente suggère que le domaine N pourrait agir comme un régulateur négatif de la multimérisation des protéines LAMP2A (Terasawa et al., 2016).

5. Internalisation et dégradation du substrat

Après sa multimérisation, la protéine LAMP2A va former un pore permettant la translocation des protéines (Fig. 5).

Cette étape est notamment assurée par une forme lysosomale de HSC70 (lys-HSC70). Les mécanismes exacts par lesquels lys-HSC70 faciliterait la translocation des protéines à l'intérieur des lysosomes ne sont pas encore clairement élucidés. Toutefois, il a été montré qu'une augmentation de cette population avait un lien direct avec une augmentation de l'activité CMA (Agarraberes et al., 1997). De plus, il semblerait que lys-HSC70 se lierait aux substrats lors de leur entrée au travers du complexe de translocation et faciliterait leur passage à l'intérieur des lysosomes. Une fois internalisées, les protéines sont finalement dégradées par les protéases lysosomales comme lors des autres voies de l'autophagie.

III. Mécanisme de régulation de la CMA

1. Régulation de LAMP2A

A ce jour, la protéine LAMP2A est considérée comme le facteur limitant de la CMA. Une augmentation de la quantité de cette protéine a directement été corrélée à une augmentation de l'activité CMA (Cuervo and Dice, 2000). Cela met donc clairement en évidence l'importance des voies de régulation de l'expression de cette protéine, comme celles régulant son transport à la membrane ou encore celles liées à sa stabilité.

a. Régulation transcriptionnelle de LAMP2A

La présence de différents stress, comme les dommages génotoxiques, le stress oxydatif ou l'hypoxie, qui conduisent tous à une augmentation de l'activité CMA, ont pour conséquences une synthèse *de novo* de LAMP2A via un contrôle transcriptionnel (Ferreira et al., 2013; Kiffin et al., 2004; C. Park et al., 2015). L'un des premiers régulateurs mis en évidence dans la transcription de LAMP2A fût NFAT1 (Nuclear Factor of Activated T-cells 1). Lors de l'activation des cellules T, la formation d'espèces réactives à l'oxygène (plus communément appelées ROS pour Reactive Oxygen Species) va induire la translocation du facteur de transcription NFAT1 dans le noyau et sa fixation sur le promoteur proximal du gène *Lamp2*, favorisant ainsi l'expression de LAMP2A et permettant l'induction de l'activité CMA (Valdor et al., 2014). Une étude plus récente a démontré que le facteur NFE2L2/NRF2 était aussi capable de moduler l'expression de LAMP2A (Pajares et al., 2018). En effet, les auteurs de cette étude ont expérimentalement validé la présence de 2 sites de fixation de ce facteur de transcription au niveau du gène *Lamp2*, et qu'une absence ou une surexpression de ce facteur était capable de respectivement diminuer ou d'augmenter l'expression de LAMP2A.

A contrario, il existe aussi des facteurs de transcription réprimant l'expression de LAMP2A. C'est le cas du récepteur de l'acide rétinoïque alpha (RAR alpha), qui inhibe spécifiquement l'expression de LAMP2A, et donc de l'activité CMA (Anguiano et al., 2013). Cependant, les mécanismes sous-jacents ne sont pas encore clairement élucidés.

b. Transport de LAMP2A aux lysosomes

L'activité CMA est également régulée par l'abondance du nombre de protéines LAMP2A au niveau de la membrane des lysosomes. Le transport de cette protéine lysosomale est donc par extension un moyen de réguler cette fonction. Il est aujourd'hui accepté que les protéines membranaires lysosomales (LMP), dont fait partie LAMP2A, sont synthétisées au niveau du Réticulum Endoplasmique (RE), puis passent par l'appareil de Golgi avant de finir par être expulsées dans le réseau trans-Golgien (TGN – Trans-Golgi Network) (Saftig and Klumperman, 2009). Arrivées dans le réseau, ces LMP pourront être prises en charge par 2 types de vésicules différentes : celles possédant un recouvrement de clathrine, et celles n'en possédant pas (Staudt et al., 2016). De récentes études tendent à montrer que la présence de cette clathrine aurait pour but de diriger dans l'espace et dans le temps la livraison des LMP que ces vésicules contiennent (Staudt et al., 2016). De plus, la présence des petites GTPases Rab11 et Rab7 ont été montrées comme nécessaires pour la bonne localisation de LAMP2A lors de son transport (Zhang et al., 2017).

La mauvaise régulation de ces transports vésiculaires spécifiquement vers les lysosomes ont pour conséquences de baisser l'apport de LAMP2A et autres protéines LAMP (LAMP1 par exemple) et ainsi de diminuer l'activité CMA (Janvier and Bonifacino, 2005). Plus récemment, de nouvelles données ont montré que des patients atteints de cystinose (maladie entraînant une accumulation de cystine dans les lysosomes) présentaient un mauvais transport de la protéine LAMP2A jusqu'aux lysosomes (Napolitano et al., 2015). Ce transport est facilité par la présence de la protéine CTNS (cystinosine), qui code pour le transporteur de de cystine à la membrane lysosomal. De plus, la baisse de l'expression de protéines impliqués dans ce transport, comme RILP ou Rab11, a été observée, induisant une accumulation de LAMP2A dans ces vésicules de transport (Napolitano et al., 2015; Zhang et al., 2017).

Ces événements montrent donc bien l'importance et la finesse de la régulation du transport de ces protéines lysosomales membranaires dans la mise en place de la CMA.

c. Stabilité de LAMP2A au niveau de la membrane lysosomale

En plus de la régulation transcriptionnelle de LAMP2A et de son transport, la stabilité même du complexe dans la membrane lysosomale est importante pour que la CMA fonctionne de manière optimale.

La relation entre la macroautophagie et le stress du RE a déjà fait l'objet de nombreuses études, mais peu d'informations sont disponible concernant la CMA. Toutefois, en 2017, Li et al ont prouvé qu'un stress au niveau du RE était capable d'induire le recrutement de MKK4 (Mitogen-activated protein Kinase 4) aux lysosomes via PERK (PKR-like ER Protein Kinase) (Li et al., 2017). Le recrutement de cette kinase entraîne l'activation du pool de p38MAPK situé à la membrane lysosomale. Sa présence et son activation permettent la phosphorylation de 2 sites

de LAMP2A, la Thréonine 211 et 213, conférant à la fois une augmentation de la stabilité de LAMP2A à la membrane lysosomale, ainsi qu'une conformation active.

Il existe de nombreuses autres voies cellulaires contrôlant l'état d'activation de la CMA via la régulation de la stabilité de LAMP2A à la membrane lysosomale. L'une de ces voies est dirigée par mTORC2/AKT (mammalian Target of Rapamycin Complex 2/Protein Kinase B) (Arias et al., 2015). La voie mTORC2/AKT est capable de phosphoryler la protéine GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein), protéine essentielle dans le maintien de la forme multimérique de LAMP2A. Une fois phosphorylée, GFAP va se dimériser et va perdre son affinité avec la protéine LAMP2A, menant à la rupture de l'homotrimère (Fig. 5). Dans des conditions de stress ou de carences énergétiques, la phosphatase PHLPP1 (PH domain and leucine-rich repeat protein phosphatase 1) va être recrutée au niveau de la membrane lysosomale et va jouer un rôle clé pour inhiber la voie de mTORC2/AKT, augmentant la stabilité de LAMP2A et de la CMA.

d. Dégradation et recyclage de LAMP2A

Dans des conditions physiologiques normales, la quantité de LAMP2A à la membrane lysosomale est également régulée via le clivage et la dégradation de LAMP2A par des protéases (Cuervo and Dice, 2000). Lorsque LAMP2A est sous forme monomérique, elle se trouve dans des microdomaines riches en cholestérols ou en glycosphingolipides, bloquant ainsi sa capacité à lier les complexes substrats/HSC70. Elle va ensuite être clivée par l'action de la cathepsine A et d'une métalloprotéinase non caractérisée à ce jour. Le clivage de LAMP2A au niveau de la région située entre le domaine transmembranaire et la queue cytosolique résulte en sa désinsertion de la membrane lysosomale sous une forme tronquée qui est rapidement dégradée par les protéases lysosomales. Lors de l'activation de la CMA celle-ci est exclu du microdomaine riche en lipides afin de pouvoir servir de nouveau de récepteur membranaire aux complexes substrats/HSC70. Comme énoncé précédemment, la liaison du complexe substrat/HSC70 à la queue cytosolique de LAMP2A entraîne sa multimérisation, qui est stabilisée par la protéine chaperonne lysosomale lys-HSP90. Une fois le substrat dénaturé et transloqué, 2 mécanismes vont se mettre en place : la séparation du complexe de LAMP2A et son clivage. Dans un premier temps, c'est l'action concomitante de 2 protéines qui vont permettre le retour de LAMP2A sous forme monomérique, la protéine GFAP et la protéine EF1-alpha (Elongation Factor 1-alpha). Comme décrit précédemment, GFAP se situe au niveau du complexe de LAMP2A et permet de maintenir la stabilité de celui-ci. Mais lorsqu'il est phosphorylé, il perd son affinité avec LAMP2A et cherchera plutôt à se dimériser. Cette phosphorylation va se faire ici grâce à la protéine EF1-alpha. La protéine LAMP2A sera alors clivée par l'action de la Cathepsine A pour ensuite être dégradée par les protéases contenues dans le lysosome.

En parallèle, certaines de ces protéines LAMP2A pourront aussi être recyclées au sein de microvésicules, créant une réserve de LAMP2A et permettant ainsi un rapide recrutement de ces protéines lors de stress induisant la CMA (Cuervo and Dice, 2000).

IV. Rôle physiologique de la CMA

Comme nous avons pu en discuter précédemment, le nombre de protéines pouvant être prises en charge et dégradées par la CMA dépasse les simples protéines cytosoliques contenant un motif KFERQ canonique. Ces protéines font parties d'un très grand nombre de voies et de processus cellulaires différents, comme le métabolisme, le cycle cellulaire, la réponse aux stress, etc.... Ces données suggèrent donc que la CMA puisse exercer un rôle important dans le contrôle de nombreux processus cellulaires et donc dans le maintien de l'homéostasie des cellules, de tissus voir même de l'organisme dans son ensemble. Dans les sections qui suivent nous dresserons l'état des connaissances actuelles sur le rôle physiologique de la CMA.

1. Réponse à un stress

a. Stress nutritif

Même si une activité basale de la CMA peut être détectée dans toutes les cellules, c'est lors de longues carences en nutriments (ou en sérum) que l'activité CMA s'active le plus (Cuervo et al., 1995). Dans ces conditions, l'initiation de la CMA est plutôt tardive comparée à la macroautophagie. Par exemple, dans les cellules murines, la CMA ne s'active qu'à partir de 8h de stress nutritif et de manière exponentielle jusqu'à quelques jours, alors qu'il ne faut que 30 minutes pour induire la macroautophagie dans ces mêmes conditions (Finn et al., 2005; Fuertes et al., 2003). La mise en place de la CMA au cours de ce stress a pour principal but de recycler les protéines non essentielles afin de renouveler le pool d'acides aminés. Elle permet aussi aux cellules de s'adapter au stress en modulant leur propre protéome à des fins régulatrices. Dans le cas d'un stress nutritif, et comme décrit précédemment, c'est l'augmentation de la stabilité de LAMP2A à la membrane lysosomale qui permet d'avoir une plus grande activité CMA (Bandyopadhyay et al., 2008).

b. Stress oxydatif

En plus d'être activée lors d'un stress nutritionnel, la CMA est induite lorsque les cellules sont sujettes à un stress oxydant, et permet la prise en charge et la dégradation des protéines oxydées (Kiffin et al., 2004; Zhang et al., 2014). Des cellules dépourvues d'activité CMA présentent ainsi une forte augmentation du nombre de protéines oxydées en situation de stress oxydant (Kiffin et al., 2004). Il a aussi été montré que des protéines qui sont prises en charge par la CMA avaient une dégradation plus rapide si jamais celles-ci présentaient des marques d'oxydation. Cette accélération peut s'expliquer par plusieurs raisons. La première est que l'oxydation des protéines a pour conséquences de dénaturer légèrement les protéines, qui peuvent alors être plus facilement prises en charge par les protéines chaperonnes afin d'être emmenées à la membrane lysosomale. L'autre raison, encore en lien avec la dénaturation de ces protéines, concerne directement la translocation de celles-ci. Dans des conditions physiologiques, les protéines cibles de la CMA sont transportées au niveau de la membrane lysosomale, avant d'être dénaturées puis transloquées dans la lumière lysosomale. Cependant, le temps de dénaturation est plus court pour des protéines oxydées, car elles présenteront déjà un état de dénaturation avancé via les marques d'oxydations qu'elles possèdent. Enfin, plus

directement, le stress oxydatif entraîne une augmentation de la synthèse des ARN messagers du gène *Lamp2* et donc du nombre de LAMP2A présents dans la membrane lysosomale.

2. Régulation de processus cellulaires

Comme décrit précédemment, l'induction de la CMA survient en réponse à un stress. Cependant, sa fonction ne se limite pas qu'à la gestion de crise, elle intervient également dans divers processus cellulaires complexes. Dans les sections qui suivent, nous décrivons l'état actuel des connaissances sur le rôle de la CMA dans le contrôle d'un certain nombre de processus/fonctions cellulaires.

a. Contrôle du métabolisme hépatique

1. Métabolisme glucidique

Ce n'est qu'en 2014 qu'ont été apportées les premières données portant sur le rôle de la CMA dans le contrôle du métabolisme glucidique. L'équipe d'Ana-Maria Cuervo a démontré que des souris, dont LAMP2A était invalidé spécifiquement dans le foie (souris L2AKO), présentaient lors d'un jeûne de 24h, des perturbations importantes du métabolisme glucidique, caractérisées par une baisse importante de la glycémie et du glycogène hépatique (Schneider et al., 2014). Ces anomalies étaient le résultat d'une perte de la dégradation des plusieurs enzymes impliquées dans la glycolyse (GAPDH, Pyruvate Kinase, Enolase, Aldolase) et le cycle de Krebs (Malate Déshydrogénase, Citrate Synthase).. Ces résultats révélaient ainsi pour la première fois que la CMA joue un rôle central dans la régulation des flux glucidiques en contrôlant la dégradation de certaines enzymes clés du métabolisme intermédiaire.

D'autres études ont par la suite renforcé ces conclusions en démontrant que la CMA intervient également dans la régulation d'autres enzymes du métabolisme glucidique, telles que la PKM2 (Pyruvate Kinase Muscle isoform 2) (Lv et al., 2011) et l'hexokinase-2 (HK-2) (Xia et al., 2015). De plus, de récentes données de protéomiques ont révélé que près de 40% des protéines considérées comme des substrats potentiels de la CMA sont impliquées dans le métabolisme, et parmi celles-ci, près de 60% portent le domaine de reconnaissance KFERQ-like (Kirchner et al., 2019).

2. Métabolisme lipidique

Les travaux menés par l'équipe d'Ana-Maria Cuervo concernant les souris L2AKO ne se limitaient pas au seul métabolisme glucidique. En effet, au-delà des effets déjà mentionnés, ces souris présentaient une stéatose hépatique, caractérisée par une augmentation significative du nombre et de la taille des gouttelettes lipidiques, accompagnée d'une accumulation de cholestérol et de triglycérides (TGs) (Schneider et al., 2014). Ces anomalies s'associaient aussi à des déficiences dans la dégradation de plusieurs enzymes impliquées dans le métabolisme lipidique. L'analyse protéomique réalisée sur les foies des souris L2AKO a ainsi mis en évidence que près de 30% des protéines identifiées comme des substrats potentiels de la CMA jouent un rôle crucial dans le métabolisme des lipides, avec une prédominance dans la synthèse des TGs, le métabolisme stéroïdien, le transport et la liaison des lipides (Kirchner et al., 2019; Jaime L. Schneider et al., 2014). Dans l'ensemble, ces résultats démontrent ainsi que la CMA

joue un rôle essentiel dans la régulation du métabolisme lipidique en participant activement au contrôle de la dégradation de nombreuses enzymes associées.

Plus récemment, une étude menée par Susmita Kaushik et Ana Maria Cuervo a montré des résultats similaires dans des cellules hépatiques et des fibroblastes L2AKO (Kaushik and Cuervo, 2015). Les cellules présentaient une accumulation importante des TGs associée à une augmentation du nombre et de la taille des gouttelettes lipidiques. Les auteurs de cette étude montrent que cette accumulation dans les cellules L2AKO n'est pas seulement due à un défaut de dégradation des enzymes lipogéniques mais également à une absence de dégradation de protéines appelées Perilipines (PLIN) (Kaushik and Cuervo, 2015). Celles-ci, présentes au niveau de la membrane des gouttelettes lipidiques, constituent une barrière contre l'action des lipases cytosoliques ou de la macroautophagie (Alfaro et al., 2018). Ces résultats démontraient ainsi le rôle essentiel de la CMA dans la dégradation des PLIN en situation catabolique afin de rendre accessible les gouttelettes lipidiques aux lipases cytosoliques et la macroautophagie dans le but de libérer des acides gras pour la fourniture d'énergie via la β -oxydation. En outre, ils mettaient en lumière l'existence de relations étroites entre les différentes voies cataboliques pour générer de l'énergie en situation de stress (Onal et al., 2017).

b. Contrôle de la différenciation adipocytaire

L'adipogenèse est un processus finement orchestré qui se déroule en plusieurs étapes, au cours desquelles les pré-adipocytes se différencient en adipocytes. De nombreuses données existent sur les régulations transcriptionnelles (induction et répression) de gènes au cours cette transition. Cependant, très peu de données sont disponibles sur la régulation des protéines clés dans ce processus. Récemment, le groupe d'Ana Maria Cuervo a pu mettre en évidence la présence et l'action de la CMA au cours de la différenciation adipocytaire. Ils ont montré que la CMA régule l'adipogenèse à différentes étapes en dégradant des protéines de signalisation régulatrices clés (comme PLIN2) et des facteurs de transcription régissant la prolifération ainsi que l'adaptation énergétique (Kaushik et al., 2022).

c. Contrôle de la réponse immunitaire

Le rôle de la macroautophagie dans la réponse immunitaire est bien documenté (Deretic and Levine, 2018; Münz, 2011; White et al., 2021). Par contre, très peu de données existaient jusqu'à récemment quant à celui de la CMA. En 2014, Valdor et al., a cherché à déterminer si l'activité de la CMA jouait un rôle dans l'activation des cellules T (Valdor et al., 2014). Pour ce faire, les chercheurs se sont d'abord concentrés sur l'expression de LAMP2A lors de l'activation de ces cellules via la stimulation du TCR (T Cell antigen Receptor). Ils ont observé une induction de l'expression de LAMP2A dans ces cellules après activation. Ils se sont ensuite intéressés à la cause de cette transcription abondante de LAMP2A, et ont suggéré qu'elle pouvait provenir d'une plus forte présence de ROS, comme cela avait déjà été observé dans des fibroblastes. Ils ont alors bloqué la transcription de 2 enzymes clés dans la production de ROS via le TCR (RISP et Duox1), et ont confirmé une plus faible transcription de LAMP2A après stimulation via des signalisations de transfert calcique. En se concentrant sur ces voies calciques, ils ont pu identifier un facteur de transcription clé : NFAT (Nuclear Factor of Activated T-cells). Ce facteur présente de nombreux sites de fixation sur le promoteur proximal du gène de *Lamp2*, permettant une régulation transcriptionnelle. Au-delà de cette activation, ils

ont mis en évidence que la CMA dégradait spécifiquement 2 protéines responsable de l'inhibition de la voie du TCR, ITCH et RCAN1. La dégradation de ces protéines a pour conséquence de maintenir une activation efficace des cellules T et une production de cytokines.

En plus de la régulation de la voie du TCR, des études ont pu montrer l'impact de la CMA dans la mise en place de la réponse immunitaire innée en régulant la voie cGAS/STING (rôle dans l'infection virale en prenant en charge les ADN cytoplasmiques). Lors de l'activation de cette voie, Trim38 effectue des sumoylation sur ces 2 protéines, afin de garantir leur stabilité, leur activation et empêcher leur dégradation. A la fin de la réponse immunitaire, ces 2 protéines vont être desumoylées par Senp2, ce qui aura pour effet de découvrir un motif KFERQ-like caché par cette modification post-traductionnelle et ainsi permettre leur reconnaissance et leur prise en charge par la CMA pour être dégradées.

Ces 2 exemples démontrent l'importance que peut avoir la CMA dans la régulation de la réponse immunitaire, qu'elle soit innée ou adaptative.

d. Contrôle de la réparation de l'ADN et du cycle cellulaire

Les travaux de Park et al en 2015 mettent pour la première fois en évidence la présence et l'implication de la CMA dans la réparation de l'ADN et la régulation du cycle cellulaire (C. Park et al., 2015). Les chercheurs ont montré que l'absence de la CMA lors de dommages génotoxiques (induisant des dommages à l'ADN) accentuait la sensibilité des cellules à de nouveaux stress et/ou dégâts. En l'absence de CMA, les marqueurs des cassures de l'ADN ne diminuaient pas, indiquant une déficience dans la réparation des cassures. Dans ces conditions, les chercheurs ont observé une forte accumulation de la protéine CHK1 (checkpoint kinase 1), connue pour jouer un rôle clé dans le contrôle du cycle cellulaire et de la réparation de l'ADN. L'identification d'un motif KFERQ-like dans la protéine CHK1 suggérait que celle-ci puisse être une cible directe de la CMA. Comme suspecté, après mutation dudit motif, sa reconnaissance et sa prise en charge par la protéine HSC70 ne se faisait plus. Enfin, l'absence de CMA a également entraîné une baisse de la stabilité du complexe MRN (Mre11-Rad50-Nbs1) impliqué dans la réparation des cassures double brins de l'ADN. Dans l'ensemble, ces résultats soulignaient ainsi l'importance de la CMA dans le contrôle de la réparation de l'ADN et du cycle cellulaire.

e. Contrôle de l'horloge circadienne

Le rythme circadien ajuste les fonctions physiologiques au cycle nyctéméral (jour-nuit) via des modifications oscillatoires de l'abondance de protéines impliqués dans le programme transcriptionnel de l'horloge. L'élimination temporelle de ces protéines par différents systèmes protéolytiques est nécessaire pour assurer un bon fonctionnement de l'horloge (Juste et al., 2021). Récemment Juste et al. ont mis en évidence une interaction fonctionnelle entre l'horloge circadienne et la CMA, dans laquelle la CMA contribue à l'élimination rythmique des protéines de l'horloge (Juste et al., 2021). Les auteurs de cette étude montrent ainsi que la perturbation de la CMA *in vivo* entraîne (i) des décalages temporels dans la dégradation de certaines protéines comme BMAL1 et CLOCK et (ii) des rythmes circadiens perturbés, ressemblant à ceux observés dans les troubles du sommeil ou au cours du vieillissement. A l'inverse, la présence

d'une activité CMA cyclique est régie par le cycle circadien lui-même, et des changements dans cette rythmicité entraîne des modifications dans le protéome lysosomal.

V. Pathologies associées

1. Maladies neurodégénératives

Le premier lien entre un dysfonctionnement de la CMA et une maladie humaine a été établi avec la maladie de Parkinson (Cuervo et al., 2004). Depuis lors, une défaillance de la CMA a été associée à un nombre croissant de troubles neurodégénératifs (Kaushik and Cuervo, 2018).

La CMA contribue à la dégradation de plusieurs protéines ayant tendance à s'agréger, et par conséquent, une diminution de l'activité de la CMA entraîne l'accumulation d'agrégats toxiques pour les cellules. Il est ainsi clairement établi que les variantes pathogènes de plusieurs protéines ciblées par la CMA sont impliquées dans la maladie de Parkinson, la maladie d'Alzheimer, les dégénérescences lobaires fronto-temporales ou encore la sclérose latérale amyotrophique. Parmi celles-ci, nous retrouvons l' α -synucléine (Cuervo et al., 2004; Mak et al., 2010; Malkus and Ischiropoulos, 2012; Martinez-Vicente et al., 2008; Vogiatzi et al., 2008), PARK7 (Wang et al., 2016), la leucine-rich repeat serine/threonine-protein kinase 2 (LRRK2) (Orenstein et al., 2013) et l'ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1 (UCHL1) (Andersson et al., 2011; Kabuta et al., 2008) (impliquées dans la maladie de Parkinson), la protéine Tau (Wang et al., 2009) et la protéine TAR DNA-binding 43 (TDP-43) (Huang et al., 2014) (impliquées dans des pathologies telles que la maladie d'Alzheimer ou la démence fronto-temporale) et la huntingtine (Bauer et al., 2010; Koga et al., 2011a; Qi et al., 2012) (impliquée dans la maladie de Huntington). Cependant, il est possible qu'un plus grand nombre de protéines associées à la neurodégénérescence soient des substrats de la CMA, car beaucoup d'autres protéines impliquées dans ces maladies contiennent le motif de ciblage KFERQ.

Une caractéristique commune de ces protéines liées à la neurodégénérescence est que, dans la plupart des cas, la protéine non modifiée se comporte comme un substrat conventionnel de la CMA, tandis que les variantes pathogènes sont ciblées vers les lysosomes mais ne sont pas dégradées et inhibent la CMA. Dans la maladie de Parkinson par exemple, les formes pathogènes de l' α -synucléine (Cuervo and Wong, 2014; Martinez-Vicente et al., 2008; Xilouri et al., 2009), de l'UCHL1 (Andersson et al., 2011; Kabuta et al., 2008) ou de LRRK2 (Orenstein et al., 2013) se lient à HSC70 mais, contrairement à leurs homologues non mutés, ils interagissent anormalement avec les composants de la CMA à la membrane lysosomale et induisent des défauts d'assemblage de LAMP2A en complexe multimérique de translocation (Orenstein et al., 2013). Le blocage de l'entrée de ces protéines pathogènes dans le lumen lysosomal induit ainsi la formation d'agrégats protéiques à la surface des lysosomes, entraînant une inhibition de la dégradation médiée par la CMA d'autres substrats et une perturbation générale de la protéostasie neuronale (Cuervo et al., 2004; Huang et al., 2014; Kabuta et al., 2008; Mak et al., 2010; Martinez-Vicente et al., 2008; Vogiatzi et al., 2008; Xilouri et al., 2009). En ce sens, il a été démontré que l'augmentation in vitro et in vivo de la CMA avec de petites molécules (Anguiano et al., 2013) ou par expression virale de LAMP2A (Xilouri et al., 2013) permet de réduire les niveaux d' α -synucléine et de limiter la neurodégénérescence (Xilouri et al., 2013). De même, l'expression de Nrf2 (un inducteur de l'expression de LAMP2A, Cf. Chap.

I, iii, 1, a) dans les astrocytes ralentit le déclin de la CMA chez les souris atteintes de la maladie de Parkinson et a un effet neuroprotecteur (Gan et al., 2012).

Tout comme les protéines liées à la maladie de Parkinson, les formes mutantes de la protéine tau (impliquées la maladie d'Alzheimer) sont ciblées vers les lysosomes mais échouent à atteindre le lumen lysosomal (Wang et al., 2009). Toutefois, dans ce cas, les protéines mutantes ne perturbent pas la multimérisation de LAMP2A, mais leur translocation à travers ce complexe est arrêtée à mi-chemin dans le lumen lysosomal (Wang et al., 2009). La translocation incomplète de la protéine tau mutante entraîne ainsi son clivage partiel en peptides hautement amyloïdogènes qui forment des oligomères irréversibles à la membrane lysosomale, inhibant in fine la CMA (Wang et al., 2009). La CMA contribue également à la dégradation d'autres protéines liées à la neurodégénérescence, telles que RCAN199, l'ubiquilin 1 (Wang et al., 2009) et la protéine TDP-43 (Huang et al., 2014), mais moins d'informations sont disponibles sur la dégradation par la CMA de leurs variantes pathogènes ou sur leur impact sur la CMA. Une relation inattendue a été suggérée entre la CMA et la protéine précurseur amyloïde (APP), une protéine étroitement associée à la maladie d'Alzheimer (Park et al., 2016). L'APP est une protéine membranaire qui subit un clivage physiologique pour libérer un court fragment cytosolique présentant le motif de ciblage KFERQ. Bien que des preuves directes de sa dégradation par la CMA fassent toujours défaut, il a été montré que la mutation de ce motif entraîne une accumulation cytosolique de ce petit peptide hautement toxique (Park et al., 2016).

Bien que la plupart des études témoignent d'un dysfonctionnement de la CMA dans les troubles neurodégénératifs, dans la maladie de Huntington, l'activité de la CMA est à l'inverse induite, probablement en réponse à une défaillance de la macroautophagie (Koga et al., 2011a). De façon intéressante, la CMA pouvant dégrader aussi bien la huntingtine « normale » que sa forme mutante (qui s'agrège dans les neurones affectés), le ciblage artificiel de cette dernière par la CMA s'est révélé efficace pour réduire la neurotoxicité dans des modèles murins expérimentaux (Wu et al., 2015). Cependant, l'applicabilité thérapeutique de la réorientation de la huntingtine mutante vers la CMA peut être limitée par le fait que le déclin normal lié à l'âge de l'activité de la CMA est accéléré dans le cerveau atteint de la maladie de Huntington (Koga et al., 2011a).

Enfin, des associations entre la CMA et d'autres protéines neuropathogènes (telles que le prion), ainsi que la présence de perturbations au sein de la machinerie de la CMA dans des conditions telles que l'ischémie cérébrale ou les lésions traumatiques du cerveau et de la moelle épinière, ont commencé à apparaître (Kaushik and Cuervo, 2018).

2. Cancers

Bien que les liens entre la CMA et le cancer n'aient été établis que récemment, certaines caractéristiques clés communes de ces interactions ont déjà été éclaircies. L'activité de la CMA est fortement induite dans la plupart des lignées cellulaires cancéreuses, et les niveaux des composants de la CMA, principalement LAMP2A, sont élevés dans un large éventail de tumeurs humaines (Kon et al., 2011; Le Li et al., 2016; Saha, 2012). Ainsi, l'inhibition de la CMA dans les cellules cancéreuses affecte négativement leur survie et diminue leur tumorigénicité. De même, le blocage de la CMA dans des xénogreffes préformées provoque le rétrécissement de la tumeur et réduit les métastases (Kon et al., 2011).

Les bases de l'effet pro-oncogène de la CMA sont probablement multiples et dépendent du type et du stade du cancer. Néanmoins, plusieurs explications peuvent être avancées. Par exemple, la contribution de la CMA au contrôle qualité des protéines peut expliquer en partie pourquoi l'induction de la CMA offre aux cellules cancéreuses plusieurs avantages en termes de survie, notamment dans la résistance à l'hypoxie, au stress oxydatif et aux dommages à l'ADN (caractéristiques d'un microenvironnement tumoral en croissance et de la plupart des interventions anti-oncogéniques). Mais le rôle de la CMA dans la croissance tumorale va au-delà du simple contrôle qualité des protéines endommagées, et a été associé à la dégradation sélective de certaines protéines régulatrices bien spécifiques. Ainsi, l'activité de la CMA est nécessaire dans certains cancers pour maintenir l'effet Warburg (c'est-à-dire la glycolyse aérobie importante pour la progression tumorale) (Kon et al., 2011; Lv et al., 2011). La dégradation par la CMA de certaines enzymes glycolytiques, telles que la pyruvate kinase (PKM2) acétylée, entraîne ainsi une augmentation des niveaux d'intermédiaires glycolytiques, favorisant ainsi la croissance et la prolifération (Lv et al., 2011). De plus, la CMA réduit indirectement les niveaux de p53, libérant ainsi son inhibition transcriptionnelle sur des enzymes glycolytiques clés et entraînant des taux de glycolyse plus élevés (Kon et al., 2011). La CMA soutient également la croissance tumorale en dégradant des protéines antiprolifératives (comme la protéine RhoE liée à la GTP (RND3)) (Zhou et al., 2016), des protéines suppresseurs de tumeurs (comme MST1 (L. Li et al., 2016), PEA-15 (pour 15 kDa phosphoprotein enriched in astrocytes) (Quintavalle et al., 2014) et la p53 mutante (Vakifahmetoglu-Norberg et al., 2013)) ou encore des protéines pro-apoptotiques (comme le composant de liaison de Bcl-2 3 (BBC3)), et en contribuant indirectement à stabiliser des protéines pro-survie telles que la protéine de différenciation des cellules de leucémie myéloïde induite MCL1 (Suzuki et al., 2017). Ainsi, le blocage de la CMA dans les cellules cancéreuses provoque un stress oxydatif et une sensibilité accrue aux agents chimio-thérapeutiques et à l'apoptose (Saha, 2012). Cette stratégie est actuellement intensivement étudiée en tant qu'intervention possible contre les tumeurs.

Toutefois, malgré ce rôle pro-tumorigène de la CMA dans les cellules cancéreuses, il est important de noter que le rôle de la CMA dans les cellules « non transformées » est singulièrement opposé, et que de toute évidence, la CMA joue un rôle anti-oncogène dans des conditions physiologiques. En effet, il est aujourd'hui clairement établi que la CMA joue le rôle de suppresseur tumorale dans les cellules non tumorigènes en accélérant notamment la dégradation protéasomale de MYC, et en abolissant ainsi son activité oncogénique (Gomes et al., 2017). La CMA peut également protéger contre la transformation maligne en assurant la stabilité du génome grâce à son rôle dans la réparation de l'ADN (Park et al., 2015). La diminution progressive de la CMA avec l'âge peut ainsi contribuer au risque accru de transformation maligne liée au vieillissement. En fait, les souris présentant un blocage hépatique de la CMA développent spontanément des tumeurs (Schneider et al., 2015).

La CMA se présente donc comme les 2 faces d'une même pièce lorsqu'il s'agit de cancer. Dans des cellules encore non transformées, elle joue un rôle de défense afin d'empêcher toute initiation de la maladie, en régulant notamment le niveau de certaines protéines. Lorsque les cellules commencent à se transformer, la CMA continuera d'être sollicitée, mais les protéines qui seront prise en charge correspondront à des protéines anti-tumorales et pro-apoptotiques.

3. Maladies métaboliques

En 2014, l'équipe de Ana Maria Cuervo a révélé pour la première fois une fonction jusqu'alors inconnue de la CMA dans le contrôle du métabolisme hépatique (Schneider et al., 2014). Comme déjà évoqué précédemment, ils ont démontré que la perte de la CMA entraînait des anomalies prononcées du métabolisme hépatique des glucides et des lipides. En outre, l'analyse du protéome lysosomal de souris témoins et de souris LAMP2A KO leur a permis de démontrer que des enzymes clés du métabolisme des glucides et des lipides étaient spécifiquement ciblées et dégradées par la CMA, et que l'altération de leur dégradation provoquait des anomalies métaboliques chez les souris défectueuses en CMA (Schneider et al., 2014). Dans leurs travaux ultérieurs, les mêmes auteurs ont démontré que les protéines associées aux gouttelettes lipidiques, PLIN2 (pénilipine 2) et PLIN3, sont des substrats de la CMA et que leur dégradation par la CMA favorise la lipolyse (Kaushik and Cuervo, 2015). L'ensemble de ces données suggérait ainsi que des dysfonctionnements de la CMA puissent conduire à l'apparition de maladies métaboliques telles que la stéatose hépatique non alcoolique (NAFLD). Mais ce n'est que récemment que Ma et al. ont démontré que l'activité de la CMA était réduite dans les tissus hépatiques de patients atteints de NAFLD (Ma et al., 2020). Les auteurs de cette étude montrent que PLIN5 est un substrat de la CMA, et que sa dégradation par la CMA est nécessaire pour la décomposition des gouttelettes lipidiques (Ma et al., 2020). Ainsi, la CMA joue un rôle essentiel en tant que régulateur du catabolisme des gouttelettes lipidiques, et l'induction de son activité pourrait constituer une piste thérapeutique intéressante pour le traitement de la NAFLD.

La CMA est également impliquée dans le diabète et/ou ses complications. En 2004, une étude menée par Sooparb et al. a révélé un lien étroit entre la CMA et la néphropathie diabétique (Sooparb et al., 2004). Ils ont constaté que l'activité de la CMA était inhibée au cours de la néphropathie diabétique, entraînant une accumulation excessive de protéines et des lésions rénales (Sooparb et al., 2004). Une étude plus récente a également démontré que l'activation de la CMA par voie pharmacologique était efficace pour prévenir d'une rétinopathie diabétique précoce, notamment en dégradant spécifiquement la protéine ACSL4 (Liu et al., 2022). La CMA peut également dégrader la protéine DDIT4/REDD1, une protéine rétinienne impliquée dans les déficits visuels chez les patients diabétiques (Miller et al., 2022). Cependant, des études *in vivo* supplémentaires seront nécessaires pour confirmer la relation existante entre la CMA et le diabète ou ses complications.

4. Autres pathologies et vieillissement

Comme évoqué précédemment, la CMA joue un rôle important dans la réponse immunitaire et notamment la présentation des antigènes (Zhou et al., 2005), et des dysfonctionnements de la CMA ont été associés à des maladies auto-immunes (Wang and Muller, 2015). La CMA régule également l'activation des lymphocytes T en dégradant de manière ciblée les régulateurs négatifs de leur activation. La modulation de l'activité de la CMA dans les lymphocytes T améliore ainsi leur fonction chez les sujets âgés (Valdor et al., 2014). Enfin, une étude récente a révélé que des anticorps IgG se liant à la région C-terminal de LAMP2A sont présents dans le sérum de patients atteints de lupus érythémateux disséminé (ou lupus systémique) et de polyarthrite rhumatoïde, suggérant l'implication de la CMA dans les maladies auto-immunes (Wilhelm et al., 2021).

Récemment des anomalies de CMA ont également été associées à l'apparition de maladies cardiovasculaires (Madrigal-Matute et al., 2022; Qiao et al., 2021). Une diminution progressive de la quantité de LAMP2A a notamment été observé dans les lésions athérosclérotiques au cours de la progression de l'athérosclérose (Madrigal-Matute et al., 2022; Qiao et al., 2021), suggérant un dysfonctionnement de la CMA. En ce sens, deux études récentes ont montré que des souris déficientes en LAMP2A dans les macrophages présentaient une progression accélérée de l'athérosclérose (Madrigal-Matute et al., 2022; Qiao et al., 2021). La déficience en LAMP2A favoriserait également la dédifférenciation des cellules musculaires lisses vasculaires, ce qui augmentait la vulnérabilité de la plaque à des risques pro-athérosclérotiques (Madrigal-Matute et al., 2022). Enfin, deux études récentes ont révélé l'implication de la CMA dans les lésions d'ischémie-reperfusion du myocarde (Ghosh et al., 2022; Subramani et al., 2021). Toutefois, les mécanismes sous-jacents restent encore à être préciser.

Le vieillissement est le principal facteur de risque associé aux maladies neurodégénératives, au cancer et aux maladies cardiovasculaires. Le vieillissement est lié à une durée de vie accrue de nombreuses protéines et à l'accumulation de protéines endommagées ou anormales à l'intérieur des cellules (Cuervo, 2008). Des preuves directes du déclin de la CMA pendant le vieillissement ont été présentées, montrant une diminution progressive des niveaux de LAMP2A et de l'activité de la CMA dans les lysosomes d'organismes vieillissants, tels que des rats et des fibroblastes humains âgés (Kiffin et al., 2007).

Des études sur des souris génétiquement modifiées ont renforcé l'importance de la CMA dans le vieillissement en montrant que son absence affecte la réponse immunitaire des lymphocytes T et accélère la défaillance de la régulation des protéines chez les souris vieillissantes (Schneider et al., 2015; Valdor et al., 2014). Finalement, des expériences de rétablissement de l'activité de la CMA ont démontré que cela pouvait améliorer la réponse immunitaire des lymphocytes T, la maintenance cellulaire et la fonction hépatique pendant le vieillissement. Ces découvertes montrent un lien direct entre la CMA et le vieillissement, suggérant que la restauration de l'activité de la CMA pourrait diminuer l'apparition de maladies liées à l'âge.

Comme nous avons pu en discuter dans cette section, la CMA est impliquée dans de nombreuses pathologies présentes dans de multiples tissus. Toutefois, il est certain que les conséquences d'une perte de l'activité CMA ne se limite pas qu'à ces pathologies. Au vu du nombre de protéines pouvant être prises en charge par la CMA, de nombreux autres processus cellulaires peuvent être touchés, de manière direct ou indirect. Que cela provienne d'un blocage de la fonction CMA dans certaines maladies ou la perte de cette fonction avec le vieillissement, ces études placent la CMA comme un régulateur central dans le maintien de l'homéostasie cellulaire. Cette voie semble donc idéale pour le développement de traitements thérapeutiques contre ces maladies.

VI. Histoire évolutive de la CMA

1. Découverte du gène *Lamp2* chez les poissons

Comme nous l'avons abordé précédemment, l'activité de la CMA dépend en grande partie de la présence et de la quantité de LAMP2A au niveau de la membrane lysosomale et de son organisation sous forme d'un complexe multimérique à sa surface. LAMP2A provient du gène *Lamp2*, qui peut aussi synthétiser 2 autres variants, LAMP2B et LAMP2C, qui ne sont

pas impliqués dans la CMA (Cuervo and Dice, 2000). Jusqu'à récemment, l'absence d'identification de la protéine LAMP2A en dehors des tétrapodes, a conduit de nombreux auteurs à considérer la CMA comme une fonction cellulaire spécifique des mammifères et oiseaux (Tekirdag and Cuervo, 2018).

Cependant, des études récentes menées conjointement par les laboratoires INRAE de St Pée-sur-Nivelle (NuMeA) et de Rennes (LPGP) ont remis en question cette idée (Lescat et al., 2020, 2018). En effet, les analyses phylogénétiques et de synténie réalisées par les deux laboratoires démontrent que ce gène est apparu il y a environ 500 millions d'années après la deuxième duplication complète du génome subit par l'ancêtre des vertébrés. Plus précisément, la première duplication totale de génome semble être à l'origine de la divergence d'un gène *LAMP* « ancestral » en 2 gènes présentant respectivement une forte homologie de séquence avec les gènes *LAMP1* et *LAMP2* et les gènes *LAMP3* et *LAMP4*, et la seconde duplication semble résulter de manière subséquente en la divergence de *LAMP1*, *LAMP2*, *LAMP3* et *LAMP4* (Fig. 7).

Notons toutefois qu'une troisième duplication totale du génome est survenue chez l'ancêtre commun des téléostéens (connu sous le nom de Teleost whole Genome Duplication ou TGD)

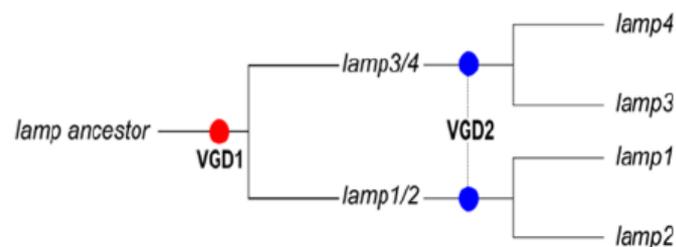


Figure 7 : Schéma de l'histoire évolutive du gène LAMP (Lescat et al., 2020)

il y a 320-350 millions d'années (Christoffels et al., 2004; Taylor et al., 2003; Vandepoele et al., 2004) impliquant, théoriquement, que deux orthologues de chaque gène *LAMP2* humain pourraient être présents chez les espèces de téléostéen, sauf s'ils ont été perdus entre temps. C'est précisément ce qui s'est passé pour la plupart des espèces de téléostéen qui n'ont conservé qu'une seule copie du gène *Lamp2*, comme chez le poisson zèbre, le médaka ou encore le brochet (Fig. 8). Par contre, chez les salmonidés deux gènes *lamp2* sont trouvés, mais semblent provenir de la duplication supplémentaire de génome (connue sous le nom de Salmonids whole Genome Duplication ou SaGD) qui a eu lieu chez l'ancêtre commun des salmonidés il y a environ 80 millions d'années (Berthelot et al., 2014; Lien et al., 2016; Macqueen and Johnston, 2014).

Dans l'ensemble ces données démontraient donc que le gène *lamp2* est bien plus ancien que nous l'avions suspecté initialement. Notons que les 3 exons « alternatifs » B, A et C sont également présents chez l'ensemble des espèces de poissons étudiés, suggérant que la protéine LAMP2A est également présente chez ces espèces. Dans les sections qui suivent, nous aborderons la question de la conservation et/ou des divergences entre espèces dans la séquence de LAMP2A. La question posée ici est : Les protéines LAMP2A présentes chez les poissons disposent-elles des séquences, motifs ou domaines nécessaires à son bon fonctionnement ?

2. Évolution des domaines et de la structure de LAMP2A

a. Le motif GYXXF

Les protéines LAMP doivent posséder au niveau de la queue cytoplasmique C-Terminale une séquence particulière qui permet leur acheminement au sein de la membrane lysosomale. Ce motif s'est révélé être GYXX ϕ , où ϕ représente un acide aminé hydrophobe. Plus précisément, dans le cas de la protéine LAMP2A, cet acide aminé est une Phénylalanile (F), qui est fortement conservé au sein des mammifères. L'importance de cet acide aminé est telle que son absence entraîne une perte de la localisation de ces protéines au niveau de la membrane lysosomale. Ce résidu hydrophobe F est également conservé dans la séquence de la protéine LAMP2A de la majorité des espèces de poisson étudiées (Fig. 9). Nous pouvons toutefois énumérer quelques variations de ce motif, comme la présence d'une Leucine (L) chez la perche ou encore l'ajout en fin de séquence d'un ou de deux résidu(s) supplémentaire(s) chez certaines espèces de poissons dont fait partie le poisson zèbre (Fig. 9). Toutefois, concernant cette dernière variation, de récentes données semblent indiquer que l'ajout d'acide aminés à la suite du résidu hydrophobe n'impacte pas la fonction de LAMP2A (Terasawa et al., 2021).

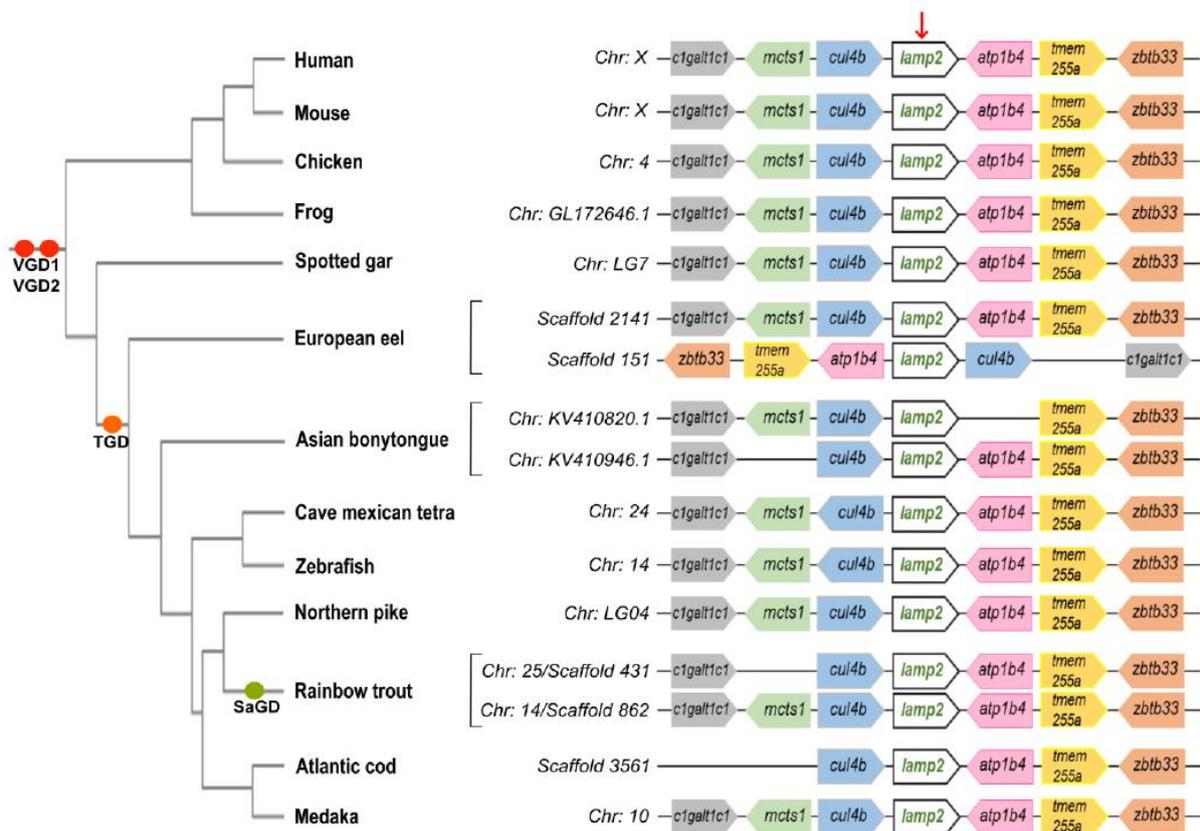


Figure 8 : Conservation de la synténie du gène *Lamp2* au cours de l'évolution (Lescat et al, 2020)

L'étude de la synténie du gène *Lamp* montre une conservation de ce gène entre les tétrapodes et les poissons. Après la TGD, la plupart des espèces n'ont conservé qu'une seule copie du gène de *Lamp2*. Par contre, après la SaGD, la truite arc-en-ciel a conservé les 2 copies du gène *Lamp2*.

VG1/2 (Vertebrate whole Genome Duplication 1/2); TGD (Teleost whole Genome Duplication); SaGD (Salmonids whole Genome Duplication)

Notons également la forte conservation du dipeptide GY dans la queue cytosolique de LAMP2A entre différentes espèces. Certaines exceptions sont encore présentes, comme dans un des 2 LAMP2A de la truite arc-en-ciel ou chez la perche. L'absence de ce motif GY pourrait suggérer un mauvais ciblage de la protéine LAMP2A au sein de la membrane lysosomale. Cependant, certaines études réalisées sur la protéine LAMP1, qui possède aussi le dipeptide GY, démontrent clairement que seule la Tyrosine (Y) a un rôle majeur dans la localisation de la protéine dans la membrane lysosomale. Au contraire, la mutation de la Glycine n'affecte pas l'adressage de LAMP1 à la membrane lysosomale (Williams and Fukuda, 1990). Elle impacterait toutefois son mode de transport aux lysosomes (Harter and Mellman, 1992; Hunziker et al., 1991).

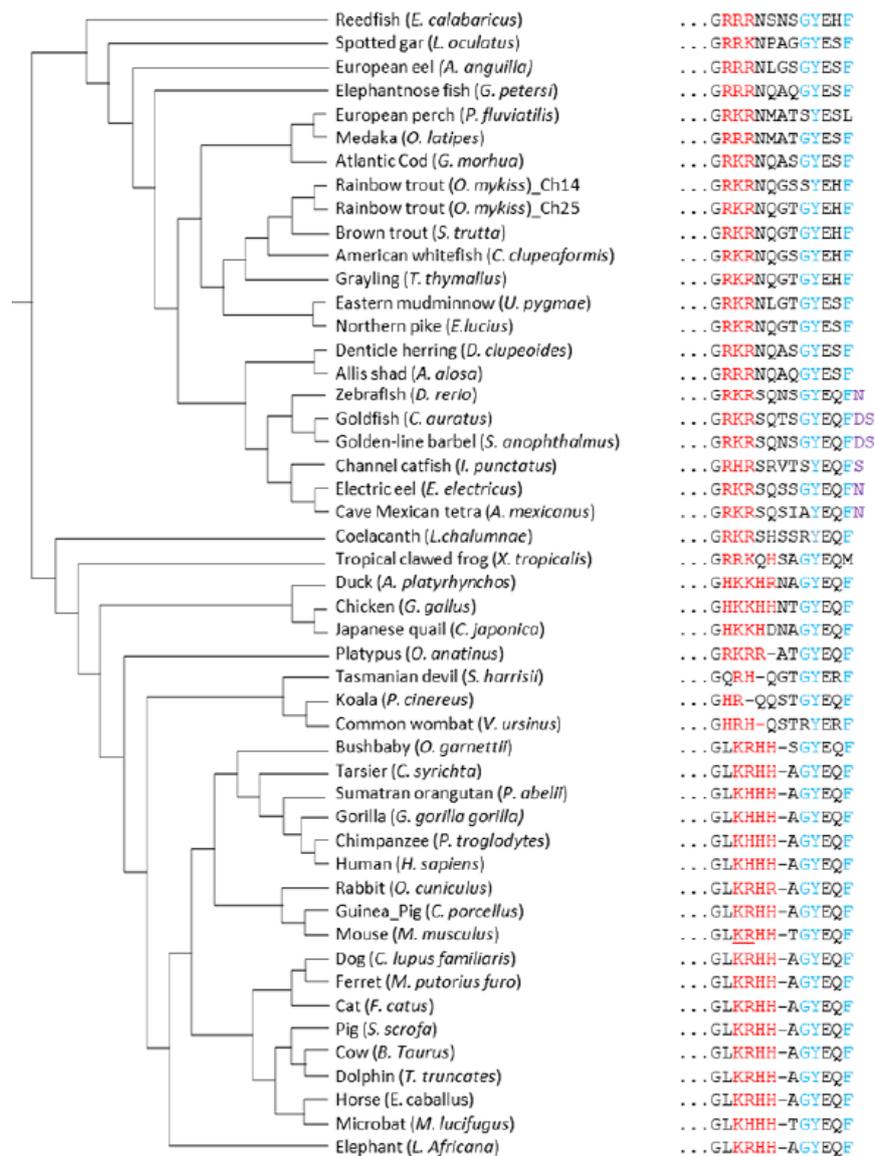


Figure 9 : Alignement des séquences protéiques de la queue cytosolique de LAMP2A entre différents vertébrés (Schnebert et al, 2022)

Les acides aminés chargés positivement nécessaire à la liaison avec les protéines substrats à apparaissent en rouge ; le doublet GY nécessaire pour l'adressage de la protéine à la membrane lysosomale apparaît en bleu ; les acides aminés supplémentaires dans la queue cytosolique des poissons du super ordre des ostariophysans apparaissent en violet ; les résidus K406 et R407 sont soulignés chez la souris.

L'ensemble de ces données suggèrent donc que les protéines LAMP2A de la grande majorité des poissons présentent les motifs nécessaires pour être correctement adressés à la membrane lysosomale afin d'y assurer une activité CMA.

b. Les acides aminés chargés positivement

La queue cytosolique des protéines LAMP2A chez les poissons, caractérisée par la présence du motif YXXF, indique qu'elles sont susceptibles d'être correctement transportées vers la membrane lysosomale. Cependant, il est important de noter que l'efficacité de ces protéines dépend également d'autres motifs situés dans leur région C-terminale. Dans le cas des mammifères, il est bien établi que la reconnaissance et la liaison du complexe substrat/chaperonnes nécessitent la présence de 3 à 4 résidus chargés positivement dans la queue cytosolique de LAMP2A (Cuervo and Dice, 2000) (Fig. 9). L'examen des séquences de Lamp2A chez les poissons révèle que, dans toutes les espèces examinées, ces protéines comportent effectivement trois acides aminés chargés positivement. Ces constatations suggèrent donc que, en plus de leurs motifs d'adressage à la membrane lysosomale, ces protéines possèdent également les motifs nécessaires à la reconnaissance des substrats.

c. Domaines LAMP

Chez les mammifères, les différents variants issus du gène *Lamp2* (LAMP2A, LAMP2B et LAMP2C) possèdent tous 2 domaines particulier situés dans la lumière des lysosomes, les domaines LAMPs (Terasawa et al., 2016; Wilke et al., 2012). Le premier, appelé domaine proximal C, est situé près de la membrane lysosomale, tandis que le second, connu sous le nom de domaine distal N, est situé à l'extrémité N-terminale de la protéine. Peu de données existent sur la fonction de ces domaines. Néanmoins, une étude a montré que la troncation du domaine

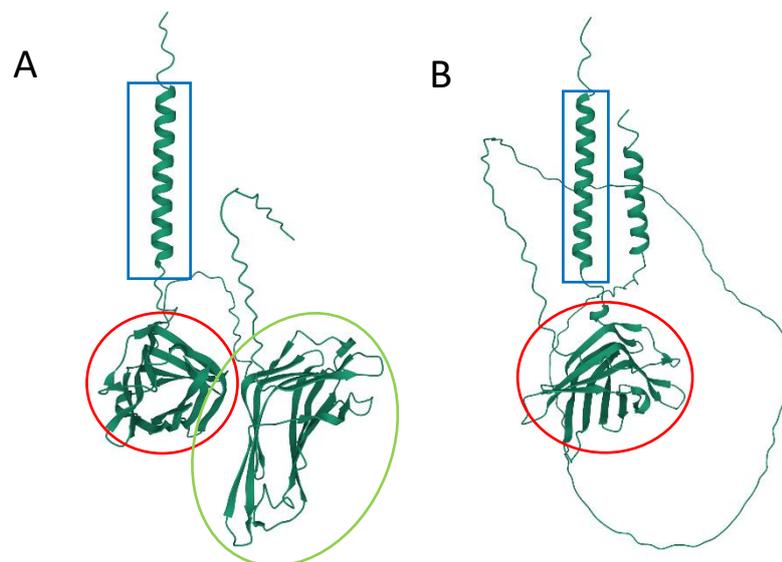


Figure 10 : Prédiction de la structure 3D de la protéine LAMP2A chez l'homme (A) et le poisson zèbre (B) (De AlphaFold Protein Structure Database)

La structure de la queue cytosolique (encadrée en bleu) et le domaine C-LAMP (entouré en rouge) sont conservés entre les 2 espèces, cependant on peut noter la perte du domaine N-LAMP (entouré en jaune) chez le poisson zèbre, remplacé par une structure mucine-like.

N chez la souris permettait un plus fort assemblage du complexe homotrimérique de LAMP2A (Terasawa et al., 2016). Le domaine N aurait donc un effet inhibiteur vis-à-vis de la formation et l'action de LAMP2A. Or l'analyse exhaustive des différents domaines LAMP2A chez différentes espèces de mammifères a mis en évidence un relâchement de la pression de conservation de la séquence protéique au niveau de ce domaine N, autorisant la mise en place d'une diversité fonctionnelle de ce domaine au cours de l'évolution des mammifères (Jalali & Parvaz, 2020). Fait intéressant, bien que ce domaine N soit relativement bien conservé chez la plupart des espèces de poissons analysés, il semble qu'elle soit absente chez les « ostariophysaires » dont fait partie le poisson-zèbre (Fig. 10), suggérant que les mécanismes de régulation de l'activité de Lamp2a puissent différer entre espèces. Toutefois, des analyses fonctionnelles supplémentaires seront nécessaires pour étayer cette hypothèse.

d. Glycines dans la région transmembranaire

Pour que les protéines prises en charge par la CMA soient correctement internalisées dans la lumière des lysosomes, la protéine LAMP2A doit former un complexe multimérique afin de former un canal (Cf section I. ii.4). Cette étape nécessite la présence du motif GAALAG au niveau de la région transmembranaire (TM) de LAMP2A (Bandyopadhyay et al., 2008; Russ and Engelman, 2000) (Fig. 11). Il a ainsi été démontré que la mutation spécifique des 2 Glycines présentes dans ce motif suffi à empêcher la bonne oligomérisation de LAMP2A ainsi que l'internalisation des substrats (Bandyopadhyay et al., 2008). Une étude sur différentes espèces de mammifères a prouvé que la présence de ces 2 Glycines étaient très conservées (Bandyopadhyay et al., 2008). On peut toutefois observer quelques modifications dans le motif GAALAG chez quelques mammifères, comme dans la famille des Muridae, dont fait partie la souris, où le motif retrouvé est GAALGG (Fig. 11). Chez les poissons, nous pouvons retrouver la présence de ces 2 Glycines dans 3 espèces uniquement, le lépisosté tacheté, l'anguille européenne et l'arowana. Dans toutes les autres espèces, seule une des 2 Glycine est présente. Cela pourrait suggérer que ces protéines LAMP2A n'aient plus la capacité (ou une moins bonne

	Lumen	Domaine Transmembranaire	Queue cytosolique
Homme	AQDCSAD-DD-N	FLVPIAVGAALAGVLIIVLLAYFI	GLKHHH-AGYEQF-
Souris	AQDCSAD-ED-N	FLVPIAVGAALGGVLIIVLLAYFI	GLKRHH-TGYEQF-
Poulet	AEDCSPE-VD-Y	FIVPIAVGAALGLVVLVIMAYFL	GHKHHNTGYEQF-
Lépisosté tacheté	AEECSDDKHD-G	FIVPIVVGVALGVLVVLVAYFV	GRRKNPAGGYESF-
Anguille européenne	AEECQADMGDAN	FVVPIAVGVALGVLIIVLVAYFI	GRRRNLGSGYESF-
Arowana	----EADKSN-S	LAVPIAVGVTLGVLVLIIVLAAYFI	GRRRNQTSGYESF-
Cavefish	AEDCQADGPD-S	FVVPIAVGIALIVLILIVLLAYFI	GRKRSQSIAYEQFN
Zebrafish	AEDCEADEPD-N	FIVPIAVGVALAVLVVVLLAYLI	GRKRSQNSGYEQFN
Brochet	AEECQDDTAE-N	WTVPIAVGVALTLLILIVLLAYFI	GRKRNQGTGYESF-
Truite arc-en-ciel Chr : 25	AEDCQDDTTE-S	WLVPIAVGVALTLLVLIIVLVAYFI	GRKRNQGTGYEHF-
Truite arc-en-ciel Chr : 14	AEDCGDDTTG-S	WIVPIAVGVALAVLILIVLIAYFI	GRKRNQGSSEYEHF-
Morue	AEDCTLD--E-S	FLVPIAVGVALVLIIVLLAYFI	GRKRNQASGYESF-
Medaka	AEECQGD-AE-S	FLVPIAVGVALLVLIIVVVAFFI	GRRRNMATGYESF-

Figure 11 : Alignement des séquences de la protéine LAMP2A entre différentes espèces (Lescat et al, 2020)

Les Glycines nécessaires à la multimérisation de LAMP2A sont marquées en rouge, les acides aminés chargés positivement pour la reconnaissance et la liaison du complexe en bleu et le motif GYXXF pour l'acheminement de la protéine à la membrane lysosomale en vert

capacité) à former le complexe multimérique et donc d'assurer le transport des substrats à travers la membrane lysosomale. Toutefois, à notre connaissance, l'effet de la mutation d'une seule glycine n'a jamais été rapporté et les données *in vitro* ainsi que *in-vivo* publiées par Lescat et al. semblent indiquer que la protéine Lamp2a de médaka, qui ne possède qu'une glycine dans le domaine transmembranaire, est capable d'assurer une activité CMA et donc la translocation des substrats à travers la membrane lysosomale (Lescat et al., 2020).

Dans l'ensemble, ces données mettent en évidence la présence, dans les séquences des protéines LAMP2A issues de différentes espèces de poisson, des motifs nécessaires à leur adressage à la membrane lysosomale, à la reconnaissance des substrats à dégrader ainsi qu'à l'acquisition d'une conformation nécessaire à la translocation de ces derniers à travers la membrane lysosomale. Elles suggèrent ainsi que les poissons puissent présenter une activité CMA semblable (ou du moins similaire) à celle décrit chez les mammifères. Toutefois, selon l'espèce considérée, ces motifs présentent un certain nombre de variations par rapport à ceux présents dans les protéines LAMP2A de mammifères. Elles soulèvent ainsi un certain nombre de questionnements quant aux spécificités de la CMA chez certaines espèces, mais également sur résidus réellement nécessaires au bon fonctionnement de LAMP2A.

3. Conservation de la fonction CMA chez le Médaka

Pendant de nombreuses années, l'étude de la CMA était restreinte aux mammifères et aux oiseaux car la présence de LAMP2A, n'était retrouvée que chez ces espèces. Les données présentées dans les sections précédentes laissent supposer qu'une activité CMA pouvait également exister chez les poissons. Cette hypothèse semblait d'autant plus vraisemblable que l'analyse de la base de données transcriptomiques *Phylofish* dédiée aux poissons avait permis d'identifier des séquences exprimées présentant une forte homologie avec LAMP2A de mammifère chez plusieurs espèces de poissons (Lescat et al., 2018).

Afin de déterminer sans équivoque si oui ou non les poissons présentent une activité CMA ou semblable à la CMA, Lescat et al., a adapté à une lignée de fibroblastes de Medaka (*Oryzias latipes*) une méthode décrite pour mesurer l'activité de la CMA dans des cellules de mammifères (Lescat et al., 2020). Brièvement, il s'agissait de transférer dans les cellules étudiées un vecteur rapporteur fluorescent photoactivable (PA) KFERQ-PA-mCherry permettant de suivre et de quantifier l'activité CMA (Koga et al., 2011b). Le principe de cette méthode réside dans la capacité à suivre la localisation de la construction KFERQ-PA-mCherry rendues fluorescentes après photoactivation (à l'aide de la lumière ultraviolette à 405nm). Lors de la stimulation de la CMA (par une mise à jeun des cellules par exemple), le rapporteur portant également la séquence KFERQ est acheminé, par la CMA, spécifiquement aux lysosomes pour être dégradé. Le signal émis par ce rapporteur passe donc d'un état diffus (le rapporteur est présent dans toute la cellule) à l'apparition de points localisés au niveau des lysosomes (Fig. 12). L'activité de la CMA peut alors être précisément mesurée par la quantification du nombre de « punctas » générés dans chaque cellule.

Cette expérience a pu clairement mettre en évidence l'existence, dans les cellules de Medaka, d'une réponse autophagique, semblable à la CMA décrite chez les mammifères (Lescat et al., 2020). Cette découverte apportait ainsi des changements conceptuels importants dans l'histoire évolutive de la CMA. En outre, elle ouvrait de nouvelles perspectives en recherche, notamment

en permettant l'utilisation de modèles animaux complémentaires, tels que le médaka ou poisson zèbre, pour mieux comprendre les mécanismes régissant la CMA.

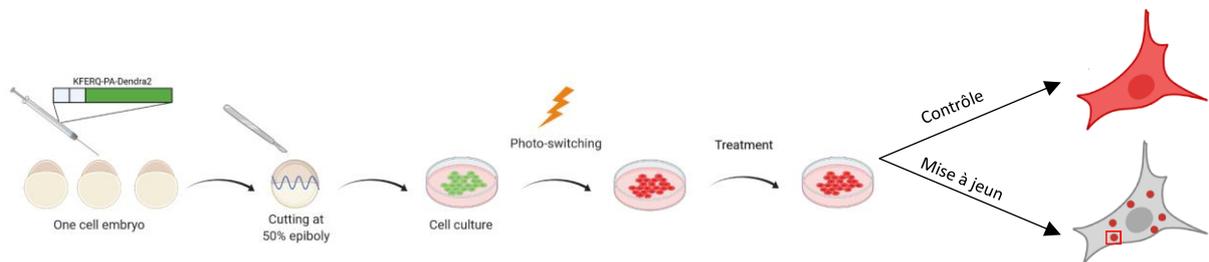


Figure 12 : Protocole expérimental pour quantifier l'activité CMA chez le poisson zèbre in-vitro

Après microinjection du rapporteur fluorescent (KFERQ-Dendra2) dans des embryons à une cellule, les cellules sont récupérées au stade 50% épibolie avant d'être mises en culture. Elles sont ensuite photoactivées puis mises en présence d'un stress (nutritif, oxydatif) avant d'être observée au microscope.

PARTIE II : Le poisson zèbre

Le poisson zèbre (*Danio rerio*) est depuis plus de 40 ans un modèle animal incontournable dans la recherche scientifique. Le poisson zèbre trouve ses origines dans les eaux douces de l'Asie du Sud, couvrant des territoires allant de l'Inde au Bangladesh en passant par le Pakistan. Observé dans des ruisseaux, rivières et rizières, ce poisson adopte souvent des comportements grégaires. Cette propension sociale offre une opportunité unique pour l'étude des dynamiques comportementales et des interactions au sein de groupes (Parichy, 2015). En 1981, Georges Streisinger a pour la première fois introduit le poisson zèbre au sein de ses recherches comme modèle génétique afin d'étudier le développement des vertébrés (Streisinger et al., 1981). De par la transparence des embryons qui se développent en dehors de la mère, le poisson zèbre représente un excellent modèle pour l'étude du développement embryonnaire chez les vertébrés. L'ensemble des étapes de développement, à partir de la fécondation jusqu'à l'organogenèse, sont clairement visible et entièrement décrit à ce jour (Kimmel et al., 1995).

Le poisson zèbre est un vertébré relativement simple, qui présente de très nombreux fonctions biologiques et processus cellulaires en commun avec l'Homme. Il présente ainsi un certain nombre d'avantages pour l'étude du développement embryonnaire, des pathologies humaines ou encore du fonctionnement des processus physiologiques et cellulaires.

Le poisson zèbre a gagné sa place en tant que modèle animal de choix dans la recherche scientifique grâce à une série d'avantages remarquables qui en font un organisme idéal dans de nombreux domaines biologiques. Dans ce chapitre, nous explorerons les avantages clés du poisson zèbre, notamment son génome entièrement séquencé, la facilité de sa manipulation génétique, sa transparence ainsi que sa reproduction rapide.

I. Un modèle d'étude incontournable

1. Un génome entièrement séquencé

L'une des caractéristiques les plus puissantes du poisson zèbre pour la recherche réside dans la disponibilité de son génome entièrement séquencé. En 2001, l'institut Sanger commença le séquençage du poisson zèbre. Le séquençage complet s'est terminé en 2013, comptabilisant un génome de 1,7 milliard de paires de bases et l'identification de plus de 26000 gènes codant pour des protéines. La comparaison de ce génome avec l'Homme a permis de mettre en évidence une similarité dans la structure génétique entre ces 2 espèces, avec un partage de plus 70% des gènes. De plus, plus de 84% des gènes que l'on sait impliqués dans des maladies humaines sont retrouvés chez le poisson zèbre. Ce séquençage offre alors une plateforme solide pour l'exploration des gènes, des voies métaboliques et des régulations génétiques. La similitude avec certains gènes humains rend le poisson zèbre particulièrement pertinent pour l'étude des maladies génétiques et des mécanismes moléculaires sous-jacents (Howe et al., 2013).

2. Une facilité de manipulation génétique

L'un des avantages de l'utilisation de poissons modèles repose sur la disponibilité d'un nombre important de lignées mutantes, qu'elles soient d'origine naturelle ou induite par l'homme. Cette facilité de manipulation génétique est une force majeure du poisson zèbre en tant que modèle, notamment pour l'étude de la fonction des gènes *in-vivo*, en particulier dans

le cadre des études portant sur le développement embryonnaire. Deux approches principales sont utilisées pour élucider la fonction d'un gène : la génétique classique (plus communément appelée par son nom anglicisé "forward genetic") et la génétique dite inverse (principalement connue sous le nom de "reverse genetic").

La génétique classique consiste à identifier le(s) gène(s) responsable(s) d'un phénotype donné obtenu après mutagenèse. Cette méthode a été la première approche en génomique fonctionnelle. Les caractéristiques du poisson zèbre, comme mentionné précédemment, ont conduit à de vastes criblages de mutagenèse chez le poisson zèbre. Un des avantages repose sur la facilité avec laquelle des mutations peuvent être induites chimiquement dans les cellules germinales des testicules de poissons zèbres adultes, ce qui peut potentiellement se traduire par des phénotypes observables chez leur progéniture.

À l'inverse, la génétique inverse commence par un gène spécifique et évalue les conséquences de sa perturbation, en étudiant essentiellement le phénotype associé au gène mutant. Cette approche tourne généralement autour de l'inhibition d'un gène et nécessite une méthode pour induire sélectivement des mutations dans le gène ciblé. Les outils couramment utilisés en génétique inverse incluent les Knock-Out/Knock-In (KO/KI) de gènes (soit par recombinaison homologue dans les cellules souches embryonnaires (ES), soit en utilisant les techniques de CRISPR-Cas9 directement dans les embryons fécondés) et le knockdown de gènes par la technologie morpholino antisens (MO) ou l'ARNi (ARN interférent).

Le poisson zèbre est particulièrement bien adapté aux criblages génétiques classiques à grande échelle, où des anomalies phénotypiques sont identifiées avant que le gène responsable ne soit connu. Cela est dû à leur abondance d'œufs, à leur courte durée de génération et au développement externe d'embryons transparents. De plus, un avantage pratique important est que le sperme des poissons zèbre peut être cryopréservé pour des recherches futures. Ces méthodes permettent des analyses ciblées et une compréhension approfondie des mécanismes biologiques (Howe et al., 2013; Nasevicius and Ekker, 2000).



Figure 13 : Visualisation du développement embryonnaire du poisson zèbre (Kazuhide Shaun Okuda for LMA/VIA 2021 Image Competition of the Australian Microscopy & Microanalysis Society)

Dès le début de l'organogenèse, il est possible d'observer les marqueurs fluorescents au microscope confocal en temps réel. Les vaisseaux sanguins sont marqués en vert et les ribosomes sont marqués en rouge.

3. Des embryons transparents

La transparence des embryons de poisson zèbre constitue un avantage remarquable pour l'observation en temps réel du développement embryonnaire. Cette caractéristique permet d'étudier visuellement la formation des organes, la différenciation cellulaire et la vascularisation sans perturber les processus naturels (Fig. 13). Les techniques d'imagerie avancées, telles que la microscopie de fluorescence à feuille de lumière (basée sur l'illumination sélective d'un seul plan d'intérêt par une nappe de lumière), exploitent cette transparence pour fournir des informations précises et détaillées (Huisken and Stainier, 2009). Cette transparence, en combinaison avec des marqueurs fluorescents, permet une visualisation en temps réel du devenir des cellules et/ou protéines directement au sein de l'organisme (Fig. 13). A contrario, chez la souris, l'étude du développement embryonnaire s'étale sur 21 jours et afin de pouvoir l'observer, le sacrifice de la mère est nécessaire, ainsi que des embryons eux-mêmes. Dans le but de pousser cette observation jusqu'à des stades plus tardifs, une lignée de poissons zèbre totalement transparents ne possèdent aucun mélanophore a été générée, grâce à l'inactivation de 2 gènes (*roy* et *nacre*) (White et al., 2008).

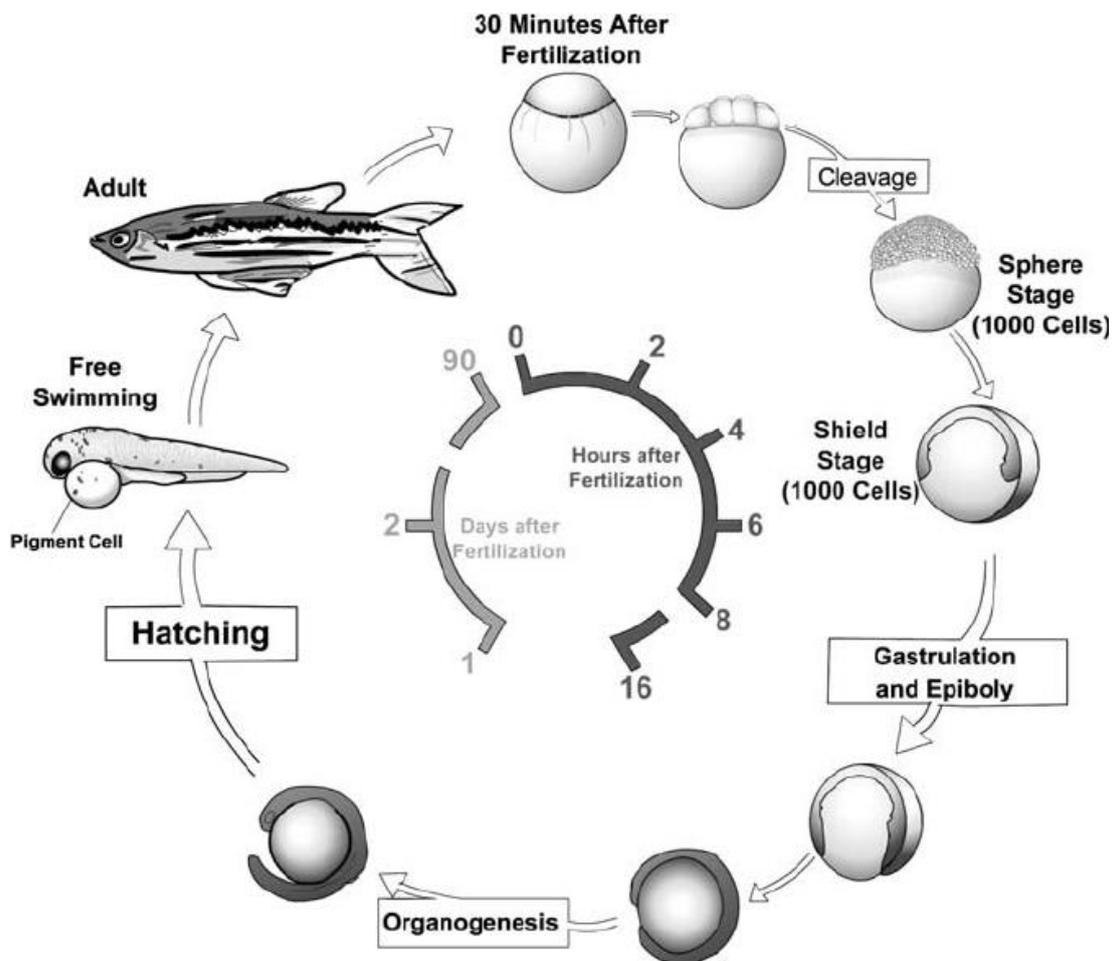


Figure 14 : Schéma du développement du poisson zèbre, de la fécondation jusqu'à l'âge adulte (D'Costa & Shepherd, 2009)

Entre la fécondation et le stade adulte, seulement 3 mois sont nécessaire au poisson zèbre pour se développer. Dès 1 jour post-fécondation, les embryons ont développer l'ensemble de leurs organes et à partir de 2-3 jours post-fécondation, les œufs éclosent.

4. Une reproduction et une croissance rapide

La capacité du poisson zèbre à se reproduire rapidement et à produire un grand nombre de descendants en peu de temps en fait un modèle animal idéal pour les études à grande échelle. Cette reproduction rapide permet aux chercheurs d'obtenir rapidement des cohortes d'animaux, ce qui est particulièrement avantageux pour les études longitudinales et les analyses de grands groupes (Spence et al., 2008). De plus, sa petite taille (entre 3 et 6 cm) permet un stockage d'un plus grand nombre d'individus comparé aux souris. Le cycle du poisson zèbre se distingue par sa reproduction rapide et prolifique. De plus, leur nourrissage et le prélèvement de leurs œufs est assez simple. Le jour précédent la fécondation, un mâle et une femelle sont maintenus séparés dans un bac spécial, avec une cloison amovible divisant le bac en 2. En retirant cette cloison le matin après l'apparition de la lumière, les femelles vont pondre des œufs (entre 50 et 200 par femelle) que les mâles fertilisent immédiatement. Afin d'obtenir des pontes optimales, les femelles doivent pondre 1 fois par semaine. Les œufs, grâce à leur développement rapide, éclosent en quelques jours seulement (entre 2 et 3 jours) après la fécondation (Fig. 14). Ensuite, durant environ 5 à 7 jours, les alevins nouvellement nés seront autotrophes et vont utiliser leur poche vitelline afin de se nourrir et se développer. Cette croissance éclair en fait un modèle privilégié pour l'observation des premières étapes de la formation des organes (Kimmel et al., 1995; Spence et al., 2008). Enfin, les poissons zèbre seront sexuellement matures à partir du 3^{ème} mois qui suit la fécondation, avec des décalages possibles suivant par l'environnement dans lequel il évolue (Fig. 14).

Cependant, durant les premières semaines post-fécondation, les gonades de cette espèce vont être bipotentielle, permettant d'obtenir des mâles comme des femelles. Chez la plupart des poissons, mais aussi des reptiles, le déterminisme du sexe est étroitement associé à l'environnement (ESD – Environmental Sex Determination), contrairement aux mammifères, qui possèdent un déterminisme du sexe associé à la génétique (GSD – Genetic Sex Determination). Chez les espèces ESD, dont fait partie le poisson zèbre, la différenciation sexuelle peut donc être précocement perturbée, voir inversée, en fonction de nombreux paramètres, comme la température de l'eau, le pH et même les interactions sociales entre individus. Dans le cas du poisson zèbre, des tests ont été menés sur cette réversion du sexe, en incubant des œufs à une température plus élevée (aux alentours de 35°C). Les résultats observés ont montré une inversion sexuelle des mâles (Uchida et al., 2004).

Ce déterminisme sexuel dépendant de l'environnement s'illustre par la formation initiale d'un ovaire juvénile chez l'ensemble des individus. La gonade va alors commencer par produire des ovocytes qui vont rentrer en méiose. Chez les futurs mâles, on pourra alors observer la dégradation de ces ovocytes, puis une maturation des gonades en testicules. Chez les femelles, l'ovogenèse va se poursuivre jusqu'à l'obtention des ovaires matures (Saito and Tanaka, 2009). En combinant l'ensemble de ces avantages, le poisson zèbre offre un éventail de possibilités exceptionnelles pour la recherche scientifique. Les sections suivantes exploreront plus en profondeur comment ces caractéristiques spécifiques ont été exploitées dans divers domaines de recherche, de la biologie du développement à l'étude des maladies humaines.

5. Le poisson zèbre comme miroir de l'évolution

Outre son intérêt pour les recherches en biologie du développement ou en santé, le poisson zèbre est aussi un modèle attractif dans le domaine de l'évolution. En effet, l'ancêtre commun des téléostéens a subi une duplication complète de son génome (TDG – Teleost whole Genome Duplication) il y a 350 millions d'années (Christoffels et al., 2004; Taylor et al., 2003;

Vandepoele et al., 2004), ce qui implique que, théoriquement, il est possible de retrouver chez ces espèces, 2 gènes orthologues pour chaque gène humain, sauf s'ils ont été perdus entre temps. Nombre de ces gènes dupliqués ont été conservés, mais ont pu évoluer différemment l'un de l'autre au cours de l'évolution, constituant un terrain de jeu idéal pour une meilleure compréhension des mécanismes à l'œuvre (néo-fonctionnalisation, sous-fonctionnalisation) dans l'évolution des gènes et fonctions.

En combinant l'ensemble de ces avantages, le poisson zèbre offre un éventail de possibilités remarquables pour la recherche scientifique. Les sections suivantes exploreront plus en profondeur comment ces caractéristiques spécifiques ont été exploitées dans divers domaines de recherche, de la biologie du développement à l'étude des maladies humaines.

II. L'utilisation du poisson zèbre dans la recherche scientifique

1. Modélisation de maladies génétiques et des cancers

Le poisson zèbre est un bon modèle pour étudier les maladies génétiques, grâce notamment à son génome très proche de celui de l'homme. L'établissement de lignées de poisson zèbre présentant des anomalies ou mutations impliquées dans des maladies humaines peut être réalisée par différents moyens : (i) la création de mutations au sein du gène étudié (responsable de la pathologie) ou (ii) la modification de l'expression des gènes cibles (surexpression ou sous-expression).

L'un des premiers modèles de cancer chez le poisson zèbre concerne le gène p53 (Berghmans et al., 2005). Ce gène, codant pour une protéine suppresseur de tumeur, est connu pour être fréquemment muté dans les cancers humains. Comme chez l'homme, sa mutation chez le poisson zèbre conduit au développement de sarcomes. Toutefois, chez ce dernier elle induit en outre d'autres types de cancers, comme des tumeurs cérébrales (Berghmans et al., 2005). Depuis cette étude, d'autres lignées de poisson zèbres exprimant une Tp53 dysfonctionnelle ont été générées. Celles-ci présentent une forte propension à développer des leucémies, mimant davantage la pathologie humaine associée (Ignatius et al., 2018).

Depuis lors, l'utilisation du poisson zèbre a permis de générer des modèles de nombreuses autres pathologies humaines. C'est le cas, par exemple, de la dystrophie musculaire de Duchenne. Les patients atteints de la maladie de Duchenne présentent une mutation au sein du gène de la dystrophine, ce qui entraîne une faiblesse dans les muscles qui se dégradent progressivement. La génération d'une lignée de poissons zèbre KO pour le gène de la dystrophine a permis d'obtenir une sévérité et une progression de la maladie semblables à celles observées chez l'homme (Berger and Currie, 2012). Comme chez l'homme, la perte de ce gène a entraîné, chez les poissons mutés, l'apparition de fibres musculaires nécrotiques, qui ont ensuite fait place à une fibrose (accumulation de fibres cicatricielles) et à des tailles de fibres largement anormales (Berger and Currie, 2012).

Un autre exemple concerne les mélanomes. La mutation la plus couramment identifiée dans les mélanomes humains induit un changement d'un seul acide aminé au sein de la protéine BRAF (B-Raf proto-oncogène, serine/threonine kinase). Une lignée portant cette mutation a été générée par KI en 2011 (Ceol et al., 2011). Cette lignée a été utilisée pour dépister d'autres mutations potentiellement responsables du cancer. Lorsqu'un autre gène (SETDB1, SET domain bifurcated histone lysine methyltransferase 1) dont des mutations sont couramment observées dans le mélanome, a été muté dans la lignée KI BRAF, un mélanome s'est rapidement

développé. Ces résultats ont contribué à établir que SETDB1 est un gène important dans la croissance du mélanome (Iyengar et al., 2012).

Dans l'ensemble, ces exemples illustrent l'utilité du poisson zèbre en tant que modèle pertinent pour améliorer nos connaissances des gènes et mécanismes associés aux pathologies humaines

2. Les xénogreffes : une alternative efficace pour l'étude des pathologies humaines

En complément des lignées de poissons zèbre génétiquement modifiées dont nous avons parlé précédemment, le recours à la transplantation de cellules cancéreuses sur des poissons « hôtes » sains s'est révélé être une technique efficace pour le suivi de l'invasion tumorale. Le poisson zèbre peut développer des cancers similaires à l'homme. Grâce à la transparence naturelle des embryons du poisson zèbre, la migration et la croissance des cellules tumorales marquées peuvent être suivies directement in-vivo (White et al., 2008). Afin que la xénogreffe ne soit pas rejetée par l'individu hôte, plusieurs dispositions peuvent être prises au préalable. La première consiste en la transplantation de cellules cancéreuses dans des embryons de poisson zèbre avant que le système immunitaire ne soit mis en place, soit 7 jours post-fécondation (Lam et al., 2004). La deuxième consiste, à éliminer cette réponse immunitaire soit avec des doses d'irradiation sub-léthales (Traver et al., 2004), soit par l'utilisation d'une lignée transgénique immunodéprimée (Tang et al., 2014). Ces techniques ont permis l'utilisation du poisson zèbre comme modèle d'étude pour de nombreuses xénogreffes, comme le mélanome (Gabellini et al., 2018), le cancer colorectal (Cabezas-Sainz et al., 2018; Fior et al., 2017; Roel et al., 2016), de la prostate (Chiavacci et al., 2015; Ghotra et al., 2015), du sein (Eguiara et al., 2011; Ghotra et al., 2012), des ovaires (Nicoli and Presta, 2007), etc....

Parmi ces xénogreffes, toutes n'ont pas été effectuées au même stade de développement. Les premières xénogreffes ont été réalisées durant le stade de la blastula (2h – 4h post-fertilisation). Des cellules de mélanomes ont été transplantées et ont pu survivre, se diviser et migrer au sein de l'embryon sans pour autant former de tumeur (Lee et al., 2005). Une étude réalisée par Haldi et son groupe en 2006, montrera par la suite qu'au stade 48h post-fertilisation, les cellules de mélanomes et d'autres types de cancers, une fois transplantées sont capable de survivre, migrer et développer des tumeurs dans l'embryon (Haldi et al., 2006).

A partir de ces résultats, de nombreuses xénogreffes ont pu être réalisées et ont permis de retranscrire un certain nombre de pathologies humaines chez le poisson zèbre. Ce fût le cas pour l'étude de l'angiogenèse tumorale. L'angiogenèse est un point crucial pour le développement de certaines tumeurs, car elle permet l'apparition de nouveaux vaisseaux destinés à répondre aux besoins métaboliques de la tumeur. A partir de poissons zèbre transgéniques exprimant la protéine VEGF2 couplée avec un fluorophore, des chercheurs ont ainsi pu (i) observer en temps réel la mise en place de cette néovascularisation, et (ii) discriminer les cellules tumorales hautement ou faiblement angiogéniques.

L'utilisation du poisson zèbre ne se limite pas aux cancers *de novo* que ce modèle peut développer. En effet, le poisson zèbre s'est révélé être un très bon modèle pour l'étude du cancer du sein ou de la prostate (Eguiara et al., 2011). Le poisson zèbre possède notamment des voies de signalisation hormonales particulièrement proche de l'homme, permettant une étude de ces cancers d'un point de vue hormonale (Lam et al., 2011).

3. Criblage à haut débit de composés chimiques

En raison de leur taille, les embryons et les larves de poisson zèbre se sont révélés très utiles pour le criblage de molécules pharmacologiques à grande échelle. Dans le cadre de la recherche contre le cancer et des pathologies génétiques, plusieurs molécules d'intérêt ont ainsi pu être identifiées.

Un premier exemple concerne le gène *Braf* que nous avons décrit précédemment. Une lignée de poissons zèbres développant un mélanome dû à une mutation du gène *braf* (V600E), a été utilisée pour cribler un panel de 2000 molécules. L'activation continue du gène *braf* a pour conséquence de maintenir un état multipotent des cellules situées au niveau de la crête neurale. Celles-ci finissent par se disséminer lors de l'initiation du cancer (White et al., 2011). A la suite du criblage, un composé a pu être identifié : le leflunomide. Celui-ci est capable d'inhiber à la fois la croissance des cellules de la crête neurale, mais aussi la croissance des cellules du mélanome. Cet arrêt de la prolifération de cellules du mélanome a pu être confirmé chez l'homme grâce à des culture *in vitro* (White et al., 2011).

Un autre exemple concerne l'angiogenèse. Alors que l'angiogenèse physiologique est finement régulée et est impliquée dans de nombreux processus, comme la prolifération cellulaire, la migration ou encore l'organisation des capillaires, l'angiogenèse pathologique joue un rôle essentiel dans de nombreuses tumeurs (Folkman, 2007). Le criblage de molécules pharmacologiques s'est imposé comme solution afin de restreindre ces dérèglements. Cependant, ces tests *in vitro* furent rapidement limités par leur incapacité à refléter la complexité d'un organisme. Le poisson zèbre est donc devenu la solution idéale pour ces tests. L'un de ces tests, mené avec des poissons zèbre transgéniques auxquels des cellules cancéreuses avaient été greffées, a amené à découvrir la Rosuvastatine, qui est capable de bloquer la croissance de cellules de cancer de la prostate. Une protéine endothéliale spécifique, couplée avec une GFP, permettait la visualisation, mais aussi la migration de ces protéines, et a ainsi permis d'évaluer en temps réel des inhibiteurs de l'angiogenèse (Wang et al., 2010).

III. Poisson zèbre et autophagie

Aujourd'hui, le poisson zèbre est un modèle bien accepté pour l'étude de l'autophagie. Cependant, son introduction dans le domaine n'est apparue qu'en 2009 grâce à l'équipe de Daniel Klionsky qui a identifié des orthologues du gènes *ATG8* chez cette espèce et a développé les lignées transgéniques Tg(CMV:GFP-Gabarap) et Tg(CMV:GFP-Lc3) pour suivre l'état d'activation de la macroautophagie directement sur des embryons vivants (He et al., 2009). Cette espèce est désormais utilisée dans de nombreuses études sur la macroautophagie (Sasaki et al. 2014 ; Lee et al., 2014). et notamment sur certaines voies de macroautophagie dites sélectives comme la mitophagie (Mandal et al., 2018), la xénophagie (Prajnsnar et al., 2018) ou encore la lipophagie (Thierer et al., 2019). Il existe d'ailleurs, aujourd'hui, de nombreuses lignées chez le poisson zèbre afin de suivre et d'étudier ces fonctions (Cui et al., 2012 ; George et al., 2014).

Certaines caractéristiques, plutôt inattendues, du poisson zèbre peuvent également s'avérer utiles pour parfaire notre compréhension du rôle de l'autophagie. En effet, le poisson zèbre a la capacité de régénérer certaines parties de son corps suite à une amputation. Comme d'autres

téléostéens, au niveau des nageoires, des processus de régénération se mettent en place et tous les principaux tissus (comprenant os, articulations et nerfs) sont en grande partie restaurés (Watson et Kwon, 2015). Grâce à l'utilisation de poisson rapporteur de la macroautophagie (fluorescent pour la protéine Map1lc3b), Varga et al. ont ainsi pu montrer que l'inhibition de cette fonction avait un impact négatif sur la régénération des nageoires (Vargas et al., 2014). Ces découvertes ont mis en évidence le rôle de l'autophagie dans la structuration et le renouvellement des tissus.

Dans l'ensemble, ce chapitre a permis de démontrer pourquoi le poisson zèbre est, depuis plus de 40 ans, un modèle animal incontournable dans la recherche scientifique. Son utilisation se généralise dans tous les domaines de recherche y compris, depuis quelques années, dans celui de l'autophagie. La découverte récente d'une activité CMA chez le médaka, suggère que cette fonction pourrait également exister chez d'autres espèce de poissons comme le poisson zèbre. Ceci laisse entrevoir une possible utilisation de celle dernière pour améliorer notre compréhension des mécanismes régissant la CMA.

Partie III : Spermatogénèse

Les travaux effectués au cours de cette thèse ont permis de mettre en évidence un rôle de la CMA, jusque-là inconnu, dans la spermatogénèse. Afin de pouvoir apprécier la portée de cette découverte, il semblait nécessaire de dédier un chapitre à ce processus.

I. La spermatogénèse

1. Différences structurelles entre amniotes et anamniotes

Le processus –ou cycle- spermatogénétique, récapitulant l'ensemble des modifications subies par une cellule germinale male du stade gonie primordiale (ou spermatogonie souche) jusqu'à produire des spermatozoïdes matures est une constante biologique commune à l'ensemble des vertébrés (Guan et al., 2006). Néanmoins, certaines différences relatives aux modalités structurelles ou de mise en œuvre de ce processus entre amniotes (mammifères, oiseaux, reptiles) et anamniotes (poissons et amphibiens) peuvent être notées.

Ainsi, dans le cas des anamniotes, une spermatogénèse sous forme cystique est observée (Fig. 15A). Celle-ci se caractérise par la présence d'extensions cytoplasmiques des cellules particulières appelées les cellules de Sertoli, qui vont venir former un véritable cyste, afin d'encercler des groupes de cellules germinales. Cette configuration permet le développement synchrone de cellules germinales dans le temps et permet aussi aux cellules de Sertoli de véritablement contrôler le devenir de ces cellules (auto-renouvellement versus division ou

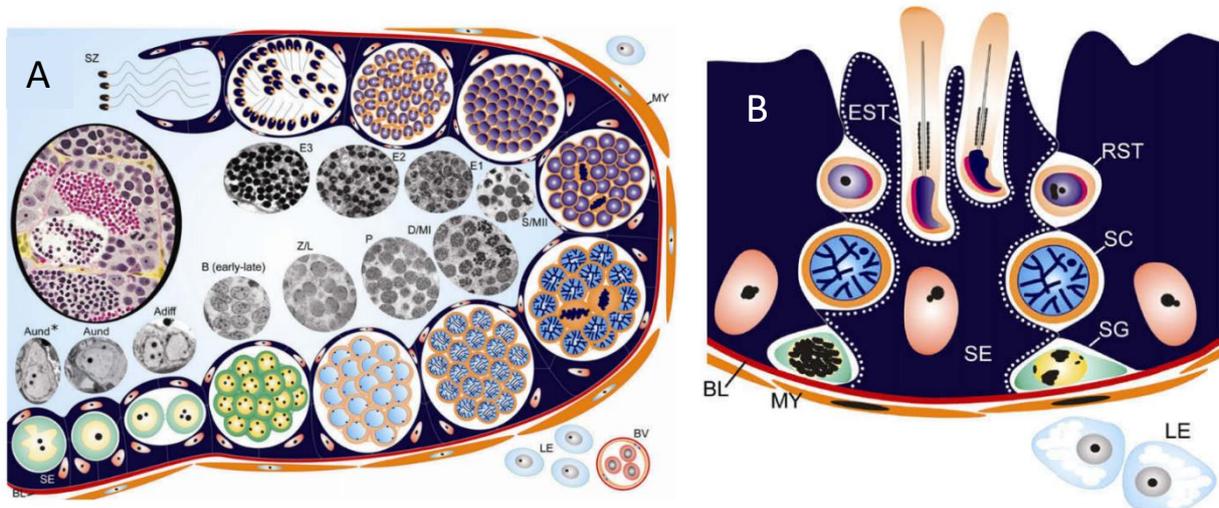


Figure 15: Comparaison de la structure des testicules entre (A) anamniote (poisson zèbre) et (B) amniote (souris) au cours de la spermatogénèse (Schulz et al, 2010)

Les cellules germinales sont incluses dans un cyste formé par les extensions cytoplasmique des cellules de Sertoli (A) ou vont migrées au travers des cellules de Sertoli (SE), en partant de la lame basale (BL) jusqu'aux tubes séminifères (B). Les cellules de Leydig (LE), les cellules myoïdes péritubulaires (MY) et les vaisseaux sanguins (BV) sont présents.

(A) Spermatogonie de Type A indifférenciée* (Aund*); Spermatogonie de Type A indifférenciée (Aund); Spermatogonie de Type A différenciée (Adiff); Spermatogonie de type B [B (early-late)]; Spermatocytes primaires au stade leptotène/zygotène (L/Z); Spermatocytes primaires au stade pachytène (P); Spermatocytes au stade diplotène/métaphase I (D/MI); Spermatocytes secondaires/métaphase II (S/MII); Précoces (E1), Intermédiaires (E2) and Spermatozoïdes finaux (E3); Spermatozoïdes (SZ).

(B) Spermatogonie (SG); Spermatocyte (SC); Spermatozoïde ronde (RST); Spermatozoïde allongée (EST)

différentiation cellulaire). En parallèle des divisions successives des cellules germinales, on pourra noter que les cellules de Sertoli vont elles aussi se multiplier, afin de continuer à approvisionner en nutriments les cellules germinales, mais aussi pour répondre à l'expansion du cyste, comme décrit chez le poisson zèbre par exemple (Schulz et al., 2005).

Chez les amniotes, la spermatogenèse ne repose pas sur la formation d'un cyste à proprement parlé (Fig. 15B). Ici, une cellule de Sertoli va soutenir le développement de nombreuses cellules germinales, qui sont le plus souvent à des stades différents (Wu et al., 2020). On retrouve la présence de spermatogonies au niveau de la membrane basale, puis, via une progression centripète, des spermatocytes, des spermatides et enfin des spermatozoïdes. La libération de ces derniers dans le tube séminifère produira après la rupture des jonctions entre les cellules de Sertoli (Wu et al., 2020).

2. Les différentes étapes de la spermatogenèse

La spermatogenèse, processus complexe et nécessairement finement organisé, consiste en la production d'un grand nombre de spermatozoïdes provenant d'un faible nombre de cellules souches spermatogoniales diploïdes (Guan et al., 2006). Bien qu'impliquant de nombreuses interactions entre différents types cellulaires, les caractéristiques générales de la spermatogenèse sont partagées entre les espèces de vertébrés (Schulz et al., 2009). Nous pouvons distinguer 3 grandes étapes : (i) la phase spermatogonale, qui correspond à la multiplication des spermatogonies à partir des cellules souches, (ii) la phase méiotique, qui engendrera les spermatocytes primaires et secondaires, et enfin (iii) la phase post-méiotique, aussi appelé spermiogenèse, qui consistera en la différenciation des spermatides (résultants des divisions méiotiques) en spermatozoïdes matures (Fig. 16).

Les modifications morphologiques et moléculaires que ces cellules vont subir au cours de ces différents stades restent assez bien conservées chez les vertébrés. Cependant, on peut noter que la durée de la spermatogenèse chez les poissons est en générale plus courte que chez les

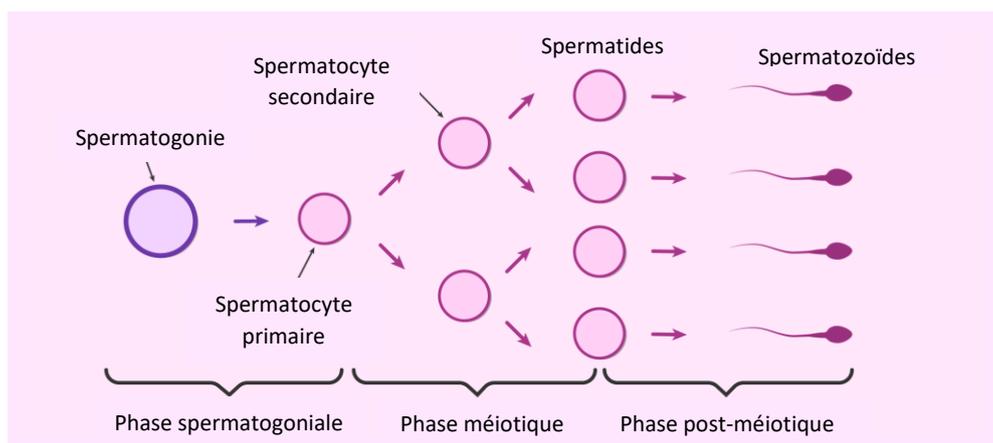


Figure 16 : Différentes étapes de la spermatogenèse (Invitra, 2022)

Au cours de la phase spermatogonale, les spermatogonies vont se différencier des cellules souches spermatogoniales et se différencier pour atteindre le stade de spermatocyte primaire. La phase méiotique va permettre la différenciation de ces cellules en spermatocyte secondaire, conduisant in fine aux spermatides. Durant la phase post-méiotique, ces spermatides vont finalement se différencier en spermatozoïdes matures avant d'être libérés.

mammifères, mais qu'elle peut être influencée par de nombreux facteurs extérieurs, comme la température de l'eau, le pH ou encore la densité d'élevage (Nóbrega et al., 2015).

a. Stades spermatogonies

On peut distinguer 3 types de spermatogonies différentes : les spermatogonies de type A, les spermatogonies intermédiaires et enfin les spermatogonies de type B (de Rooij and Griswold, 2012; de Rooij and Russell, 2000; Oakberg, 1971). Ces différents types de spermatogonies se caractérisent principalement par l'état global de la condensation de leur hétérochromatine, mais aussi par des particularités morphologiques différentes.

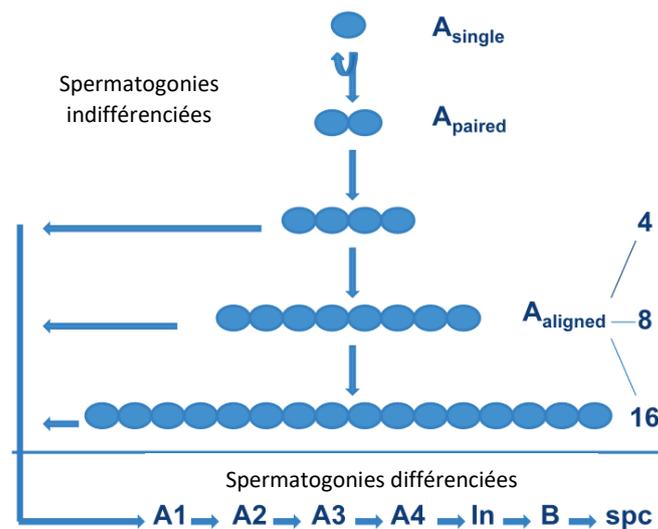


Figure 17 : Représentation schématique de la spermatogenèse (Adapté de De Rooij and Griswold, 2012)

Ensemble des étapes parcourues par les cellules germinales, en commençant par le stade indifférencié pour atteindre le stade différencié.

Spermatogonie différenciée (A1-A4) ; Spermatogonie intermédiaire (In) ; Spermatogonie de type B (B) ; Spermatoocyte (spc)

Parmi les spermatogonies de type A, nous pouvons distinguer 2 grands groupes : les spermatogonies indifférenciées et les spermatogonies différenciées. Dans le groupe indifférencié, nous retrouvons les spermatogonies isolées (A_s pour A_{single}), les spermatogonies en doublet (A_{pr} pour A_{paired}) et enfin les spermatogonies alignées (A_{al} pour A_{aligned}). Les A_{pr} se caractérisent par la présence d'un pont cytoplasmique entre les 2 cellules filles provenant d'une cytokinèse incomplète. Les A_{al} sont, elles aussi, liées par ces ponts cytoplasmiques, et leur nombre peut aller jusqu'à 16 cellules (Fig. 17) (de Rooij and Griswold, 2012).

Parallèlement à ces divisions consécutives, les A_s sont sujettes à des divisions asymétriques, donnant d'un côté une cellule souche spermatogonale qui restera dans la niche, et une autre cellule qui va entrer dans le cycle de la spermatogenèse (de Rooij, 1973; Huckins, 1971; Oakberg, 1971) (Fig. 17).

L'autre groupe de spermatogonies, dites différenciées (A), donnera naissance aux futures spermatogonies intermédiaires (In), qui engendreront à leur tour en spermatogonies de type B. C'est uniquement une fois ces cellules arrivées à ce stade qu'elles pourront rentrer en méiose (de Rooij and Griswold, 2012).

Chez les poissons, il est assez difficile de dégager une règle unique décrivant le déroulement de la spermatogenèse type, de nombreuses espèces disposant de leurs propres nomenclatures (Bosseboeuf et al., 2014; Schulz et al., 2009). Cependant, par soucis de simplification, il est aujourd'hui admis, qu'au vu du nombre de similarités retrouvées entre espèces, la description de la spermatogenèse décrite chez les rongeurs, et plus globalement chez les mammifères, soit appliquée chez les poissons (Schulz et al., 2009).

Chez les poissons, nous retrouvons donc les différents stades de développement décrit chez les vertébrés (spermatogonies, spermatocytes, spermatides et spermatozoïdes). Dans le cas du poisson zèbre, au début de la spermatogenèse, 2 types de spermatogonies de type A indifférenciées sont ainsi observées. Les premières sont considérées comme les cellules souches spermatogoniales (Aund*). Elles possèdent un très fort pouvoir d'auto-renouvellement. L'autre groupe correspond aux cellules qui vont rentrer dans le processus de spermatogenèse (Aund) (Fig. 1A).

Ces dernières vont par la suite, grâce à des divisions successives, devenir des spermatogonies de type A différenciées (Adiff), qui ne présentent pas de différences morphologiques notables avec les Aund, mais qui ont perdu leur pouvoir d'auto-renouvellement. Les Adiff vont ensuite engendrer les spermatogonies de type B, qui vont subir des modifications morphologiques plus conséquentes. Nous pourrions ainsi observer la formation de plusieurs générations de spermatogonies de type B par cyste. Cependant, à la différence des mammifères, le stade spermatogonies de type B ne représente pas la dernière étape avant l'entrée en méiose et leur transformation en spermatocytes primaires. En effet, chez les poissons, les spermatogonies de type B peuvent subir plusieurs cycles mitotiques successifs avant d'entrer ultérieurement en méiose. Dans le cas du poisson zèbre, ces mitoses peuvent ainsi générer jusqu'à 9 générations de spermatogonies (1 spermatogonie de type A, 3 générations de spermatogonies de type B indifférenciées et 5 générations de spermatogonies de type B), alors que seulement 6 sont décomptées chez la truite (Leal et al., 2009; Loir, 1999) (Fig. 18).

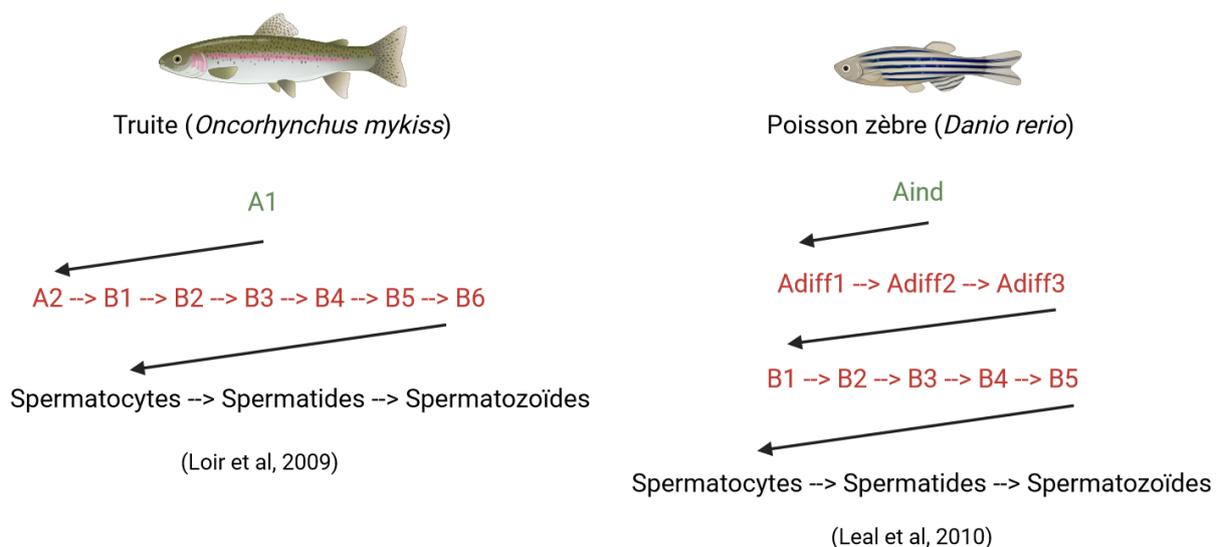


Figure 18 : Schématisation de la spermatogenèse chez la truite et le poisson zèbre

Les spermatogonies indifférenciées de type A (en vert) vont se différencier en spermatogonies différenciées (en rouge), qui seront elles-mêmes à l'origine des spermatogonies de type B. Elles vont subir plusieurs mitoses avant de rentrer dans la phase méiotique, afin de produire des spermatozoïdes.

b. Stades méiotiques

La méiose consiste en 2 divisions cellulaires successives ayant pour but d'aboutir à 4 spermatozoïdes haploïdes à partir des spermatogonies diploïdes de type B. Elle débute par la méiose I dite réductionnelle, qui correspond à la séparation des chromosomes homologues, suivi par la méiose II dite équationnelle, qui va correspondre à la séparation des chromatides sœurs.

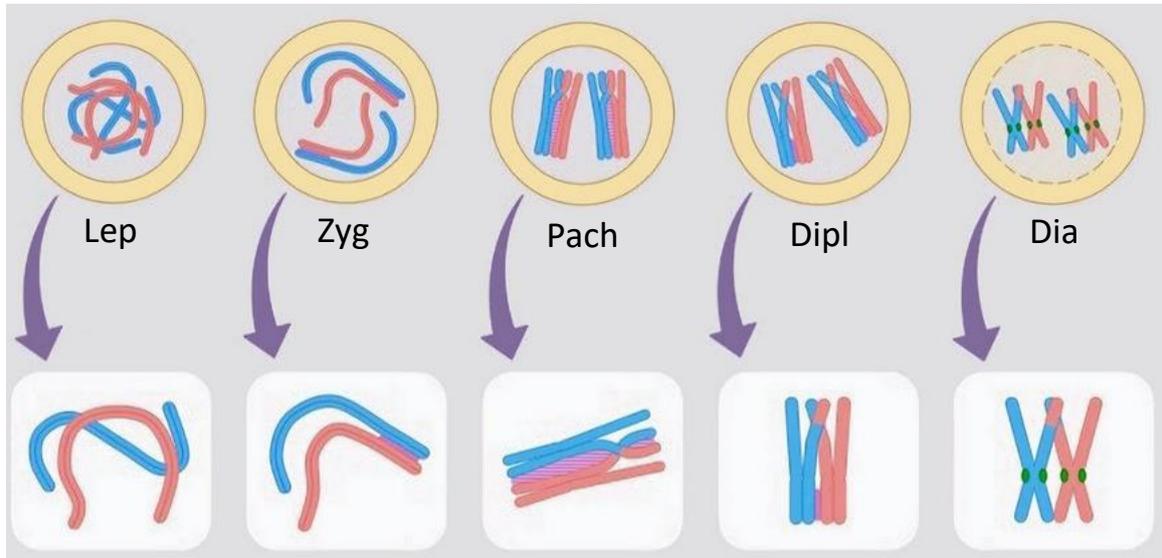


Figure 19 : Représentation schématique des 5 étapes de la prophase méiotique

Différentes étapes de la prophase méiotique qui vont permettre de produire les spermatozoïdes primaires.

Leptotène : début de la compaction de la chromatine. *Zygotène* : début d'appariement des chromosomes homologues via la formation du complexe synaptonémal. *Pachytène* : le complexe synaptonémal est formé et les chromosomes sont appariés. *Diplotène* : apparition de chiasma entre les brins des chromosomes homologues. *Diacinèse* : alignement des chromosomes, via leur centromère.

De gauche à droite : *Leptotène (Lep)* ; *Zygotène (Zyg)* ; *Pachytène (Pach)* ; *Diplotène (Dipl)* ; *Diacinèse (Dia)*.

En rouge et bleu, les chromosomes appariés avant la séparation des chromatides sœurs.

Les spermatozoïdes primaires peuvent être observés au moment de la prophase de la 1^{ère} méiose. Cette prophase est assez longue et est divisée en 5 étapes : le leptotène, le zygotène, le pachytène, le diplotène et enfin la diacinèse (Fig. 19).

Le stade leptotène correspond à la condensation des chromosomes dupliqués. On aperçoit aussi la fixation des extrémités de ces chromosomes au niveau de l'enveloppe nucléaire via la plaque d'attachement. Le stade zygotène voit naître un appariement au niveau des extrémités des 2 chromosomes, qui va progresser le long de ces chromosomes grâce au complexe synaptonémal. Lorsque l'appariement est complet, ces cellules vont arriver au stade pachytène, qui voit apparaître des nodules de recombinaisons le long de l'axe des chromosomes liés. Ces nodules vont permettre l'échange chromosomique, qui sera ensuite caractérisée par la présence de chiasma plus tard. Le stade diplotène débute par la séparation des paires de chromosomes suite à la dissociation du complexe synaptonémal. C'est surtout à cette étape que nous pouvons constater la présence des chiasma réalisés juste avant. Enfin, lors de la diacinèse, la membrane nucléaire va disparaître et va permettre l'entrée de cette cellule en métaphase I. Les

spermatocytes primaires vont ensuite poursuivre par l'anaphase et la télophase pour aboutir aux spermatocytes secondaires, qui ne contiendront qu'un seul chromosome mais avec une chromatine dédoublée. A ce stade, ces cellules vont continuer la méiose en rentrant dans la deuxième partie, la méiose équationnelle. Ainsi, deux spermatides -ne contenant chacune qu'une chromatide sœur- seront générées.

De nombreuses études ont pu mettre en évidence l'importance de la macroautophagie dans le bon fonctionnement de ce processus, mais uniquement dans les ovocytes. Ainsi, chez la drosophile, une perte de macroautophagie entraîne un retard et une mauvaise séparation des chromosomes (Matsuhara and Yamamoto, 2016). L'importance de la macroautophagie dans la maturation ovocytaire a également été rapporté chez le porc (Shen et al., 2018).

c. Stades post-méiotiques

A la fin de ces différentes étapes de méiose, les spermatides (haploïdes) formées ne vont plus subir de divisions mais vont par contre subir des changements morphologiques drastiques. Ce processus est appelé spermiogenèse. Un excédent cytoplasmique va être évacué sous forme de corps résiduels. Ces corps vont être phagocytés par les cellules de Sertoli environnantes. Les restes cytoplasmiques qui ne seraient pas éliminés vont être envoyés le long du flagelle. Parallèlement à cette étape, les mitochondries vont être rassemblées au niveau de la pièce centrale, juste en dessous de la tête du futur spermatozoïde (Vertika et al., 2020).

Une autre modification morphologique majeure est la formation du flagelle, structure ciliée et nécessaire au déplacement du spermatozoïde. Il est composé de l'axonème, qui est constitué de 2 microtubules centraux, eux-mêmes entourés de 9 paires de microtubules périphériques (Fig. 20). La motilité du flagelle, et donc du spermatozoïde, est assurée par des bras de dynéines

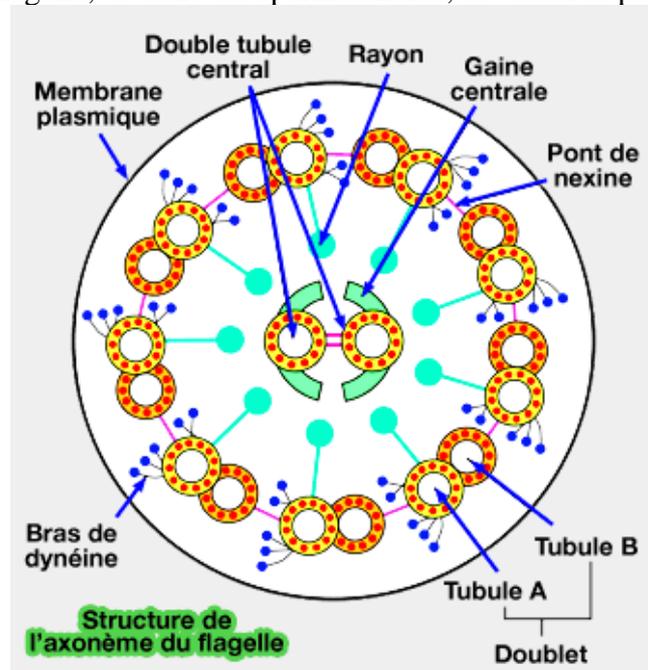


Figure 20 : Schéma de la structure d'un axonème de flagelle de mammifère (Nahed, 2015)

Nous retrouvons un double microtubule central entouré d'une gaine centrale et se terminant dans la partie proximale de l'axonème. Il est entouré par 9 paires de microtubules périphériques, avec les tubules A et B. Sur les tubules A, des bras de dynéines sont fixés et qui peuvent se lier avec le tubule B voisin pour actionner un mouvement. L'ensemble des doublets périphériques sont reliés entre eux par des ponts de nexine.

internes (IDA – Inner Dynein Arm) et externes (ODA – Outer Dynein Arm) (Ishikawa, 2017). Permettant le glissement des microtubules périphériques et induisant des courbures du flagelle, ils sont responsables des battements du spermatozoïde. De plus, fixés sur ces paires de microtubules périphériques, on peut observer la présence de rayons radiaux (Radial Spokes). Il s'agit d'un complexe protéique qui permet la transmission des mouvements mécaniques entre les microtubules centraux et périphériques (Ishikawa, 2017). Il pourrait jouer un rôle dans la régulation de l'activité de ces bras de dynéines, et donc du mouvement du flagelle (Ishikawa, 2017).

D'autres modifications morphologiques apparaissent, comme la formation d'un acrosome chez les mammifères. Il est situé au-dessus de la tête et va recouvrir le noyau. Cette organelle contient les enzymes nécessaires pour permettre aux spermatozoïdes de digérer la zone pellucide de l'ovocyte lors de la fécondation (Abou-Haila and Tulsiani, 2000). Chez les poissons téléostéens, nous ne retrouvons pas la présence de cet acrosome. Les spermatozoïdes rentrent dans le chorion et vont ensuite pénétrer dans l'ovocyte grâce à la présence d'un canal appelé micropyle (Iwamatsu et al., 1997; Ohta and Iwamatsu, 1983).

L'organisation et la régulation de l'ensemble de ces acteurs est donc primordial afin que les spermatozoïdes puissent se déplacer. Des modifications dans la structure ou des éléments qui composent l'axonème et le flagelle peuvent entraîner des baisses dans la motilité de ces spermatozoïdes. Une absence d'activité autophagique dans la régulation de la formation du flagelle a déjà été mise en évidence chez la souris et le rat (Wang et al., 2014; Yang and Yang, 2020), posant ainsi la question de son implication chez le poisson zèbre.

II. Les cellules de Sertoli, acteur majeur de la spermatogenèse

1. Généralités

Chez les mâles, les cellules de Sertoli sont parmi les premières cellules somatiques à se spécialiser lors du développement de la gonade embryonnaire (DiNapoli and Capel, 2008). Ainsi, elles jouent un rôle majeur pour l'initiation et le maintien du développement testiculaire (DiNapoli and Capel, 2008). Extrêmement plastiques tant en termes d'expression moléculaire que de morphologie, elles ont la possibilité de changer à la fois de forme et de taille en fonction des besoins des cellules environnantes (França et al., 2016). Au sein du testicule, elles sont en contact avec de très nombreux types cellulaires (comme les cellules germinales, les cellules de Leydig ou les cellules myoïdes périvitubulaires). Elles sont présentes tout au long du développement de cet organe et participent à de nombreux processus cellulaires, tels que la spermatogenèse, la phagocytose des résidus apoptotiques, ou la sécrétion d'hormones (Griswold, 1998; Wu et al., 2020).

2. Les cellules de Sertoli et le déterminisme sexuel

Chez les mammifères, dans les premières semaines post-natales, les cellules somatiques sont bipotentielles et peuvent aussi bien mener à la formation d'un testicule que d'un ovaire (Wang and Orban, 2007). Des analyses transcriptomiques à des stades de développement très précoces montrent l'expression de gènes ovariens, conduisant ainsi la formation d'ovaires comme la voie « par défaut » (Jameson et al., 2012). Le développement du testicule se met en

place lors de l'expression de gènes liés au chromosome Y, et plus particulièrement le gène SRY, dans les cellules pré-Sertoli (Wilhelm et al., 2009). Son expression va induire celle du gène Sox9, qui va permettre la différenciation de ces cellules en cellules de Sertoli matures, et ainsi diriger cette gonade vers un testicule (Rotgers et al., 2018) (Fig. 21).

Les cellules de Sertoli ont un rôle primordial dans la différenciation des cellules germinales. Le déterminisme sexuel est temporel, c'est ce qui décidera de l'orientation des cellules germinales en ovocytes ou en spermatogonies (McLaren, 2003).

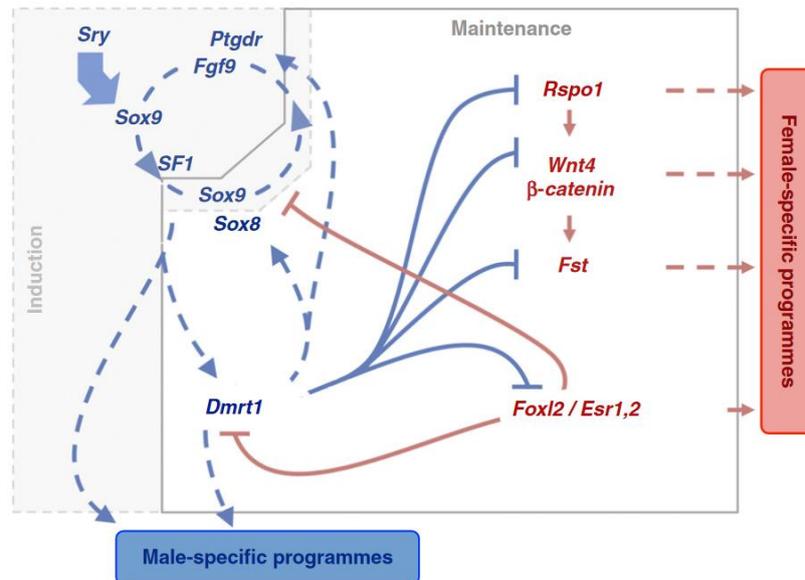


Figure 21 : Voies impliquées dans la régulation du déterminisme sexuel chez la souris (Herpin & Scharl, 2011)

Dans le cas où le gène *Sry* est activé, une cascade de protéines, emmené par *Sox9*, va orienter la différenciation sexuelle de la gonade vers un testicule. Aussi, la maintenance de cette différenciation est régie par des gènes clés comme *Dmrt1*, *Sox9* ou encore *Sox8*. Cependant, la moindre dérégulation peut basculer cet équilibre entre les voies spécifiques mâle et femelle. Cette interconnexion explique que les gonades soient bipotentielles.

Afin de conserver les caractéristiques d'une gonade mâle, les cellules de Sertoli expriment, même arrivées au stade adulte, la protéine *Dmrt1* (Doublesex and mad-3 related transcription factor 1). Cette expression est retrouvée au sein des spermatogonies. Cette protéine a pour but d'inhiber l'action de nombreux gènes qui favorisent la différenciation femelle, comme *Foxl2* (Forkhead box L2) ou la voie *Wnt/β-caténine* (Herpin and Scharl, 2011; Matson et al., 2011) (Fig. 21). En absence de *Dmrt1* au cours du développement fœtal, on peut observer l'induction d'une féminisation post-natale du testicule, causant une transdifférenciation des cellules de Sertoli en cellules de la granulosa (dédifférenciation puis spécialisation). Ces cellules proviennent du même précurseur que les cellules de Sertoli mais sont spécialisées dans le développement de l'ovaire et des ovocytes. Ces changements reflètent une grande plasticité de ces cellules (Matson et al., 2011) et de la gonade en particulier.

La présence des cellules de Sertoli est indispensable dans le développement du testicule, et ses fonctions permettent de maintenir cette différenciation. Elles sont aussi primordiales dans la mise en place et la régulation de la spermatogenèse.

3. Une barrière indispensable au cours de la spermatogenèse : la BTB

Une fois les cellules de Sertoli matures, elles vont mettre en place de nombreuses jonctions (serrées, communicantes, desmosomes) entre elles, ce qui limitera le passage de substances afin de ne pas perturber le bon processus spermatogénique.

Chez les mammifères, cette séparation va délimiter 2 zones distinctes : une zone où aura lieu la méiose des cellules germinales et une zone pour la spermiogenèse (qui correspond au dernier stade de développement du spermatozoïde) (Bergmann et al., 1984). L'environnement des cellules méiotiques est très important et fortement régulé et contrôlé lors de la spermatogenèse (Bergmann et al., 1984). L'une des structures qui maintient cet environnement clos est la barrière créée par les jonctions entre des cellules de Sertoli adjacentes (Sertoli Cell Barrier – SCB). Aussi appelé Blood-Testis Barrier (BTB), elle limite les passages, notamment de toxines et du système immunitaire, vers la partie luminale du tube séminifère et inversement (Fig. 22). Ces jonctions sont régulées par différentes protéines, comme Claudin-11 ou la protéine Occludine pour les jonctions serrées, ou encore par des hormones comme la FSH ou la testostérone (McCabe et al., 2016). La modulation de ces jonctions par l'Acide Rétinoïque (AR) (Hasegawa et Saga, 2012) ou l'Activine A (Nicholls et al., 2013), qui respectivement augmentent et diminuent le nombre de ces jonctions, reflète l'importance et les possibilités de régulation de ces jonctions. Par exemple, cette barrière est capitale pour la bonne migration des spermatocytes vers le tube séminifère (Bergmann et al., 1984). A la fin de la spermatogenèse, cette barrière va se rompre et permettre la libération des spermatozoïdes dans le tube séminifère (Pudney, 1995). Des perturbations dans la régulation et la présence de cette barrière par le biais de ces jonctions peut provoquer la mort des cellules germinales et compromettre la fertilité (Cheng and Mruk, 2012).

Chez les téléostéens, on peut aussi observer la présence de cette BTB, qui est principalement composée de jonctions serrées entre les différentes cellules de Sertoli (Bergmann et al., 1984).

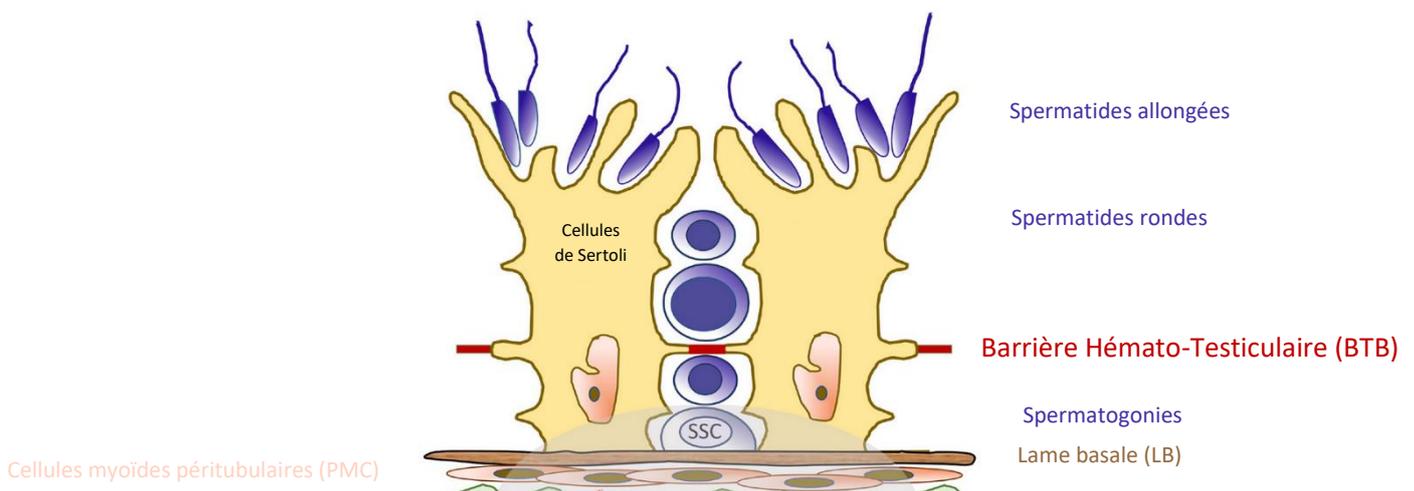


Figure 22 : La barrière hémato-testiculaire sépare 2 environnements différents dans des cellules de Sertoli de mammifères (Hofmann & McBeth, 2022)

Les SSC, posées au niveau de la lame basale, vont entrer dans le cycle spermatogénique et devenir des spermatogonies différenciées. Arrivées à ce stade, elles vont commencer les méioses et au cours de celle-ci, ces cellules vont pouvoir traverser la BTB. Une fois de l'autre côté, ces spermatocytes vont continuer à se multiplier et se différencier jusqu'à l'étape de spermiation.

Cette barrière apparait lorsque la méiose des cellules germinales est complète. Comme pour les mammifères, elle participe activement à l'isolation des cellules germinales du système immunitaire et les préserve de l'exposition à différentes toxines.

La présence de cette barrière est donc nécessaire pour la bonne mise en place de la spermatogenèse.

4. Les relations entre les cellules de Sertoli et les cellules germinales

a. Rôle dans l'auto-renouvellement des Cellules Souches Spermatogoniales (CSS) et dans l'induction de la spermatogenèse

Les cellules de Sertoli jouent aussi un rôle crucial dans le maintien du stock des CSS, qui est la première étape de la spermatogenèse. Pour cela, les cellules de Sertoli vont produire du GDNF (Glial cell Derived Neurotrophic Factor) grâce à la présence de la FSH (Follicule Stimulating Hormone) provenant de la glande pituitaire qui va stimuler la voie de Notch (Tadokoro et al., 2002). Des récepteurs de cette voie sont situés au niveau des CSS. L'intégration de ce signal permettra de maintenir la niche et l'auto-renouvellement des cellules souches spermatogoniales. De nombreuses autres voies existent telle celle médiée par la protéine FGF2 (Fibroblast Growth Factor 2) (Masaki et al., 2018). La présence de FGF2 permet l'activation de MAP2K1 (Mitogen-Activated Protein kinase kinase 1) par phosphorylation, induisant à son tour la transcription de gènes clés (*Bcl6b*, *Etv5* ou *Lhx1*) dans la maintenance du stock de CSS (Chen et al., 2005; Ishii et al., 2012).

Les cellules de Sertoli sont de véritables métronomes régulant la cadence d'entrée dans le cycle de la spermatogenèse. Ainsi il a été montré chez la souris qu'elles vont stopper l'inhibition de l'AR par CYP26B1 et produire en parallèle de l'AR (Bowles et al., 2006). L'absence de la synthèse d'AR par les cellules de Sertoli induit un blocage des spermatogonies à rentrer en méiose.

A ce jour, 2 modes de divisions des cellules de Sertoli ont été décrits chez les poissons. Dans le premier cas, les progéniteurs des cellules de Sertoli prolifèrent activement afin de créer un emplacement pour de nouvelles niches dédiées aux CSS ou aux spermatogonies. Pour cela, les cellules de Sertoli vont produire du GDNF, qui agira par voie paracrine, afin de stimuler soit la migration de CSS (que l'on retrouve aussi chez les rongeurs), soit la division de CSS pour permettre l'auto-renouvellement de ces cellules (Dovere et al., 2013). Chez le poisson zèbre, des hormones de la thyroïde, comme la triiodothyronine-T3, sont capables d'augmenter l'activité mitotique des cellules de Sertoli par la voie Igf3 (Nóbrega et al., 2015). Cette voie est d'autant plus efficace dans les cellules de Sertoli qui ne sont pas encore associées à des cellules germinales ou au contact de spermatogonies (França et al., 2016; Morais et al., 2013). Dans le deuxième cas, les cellules de Sertoli se divisent dans les cystes déjà existants, en réponse à la présence de FSH et d'androgènes, et ceci afin de répondre au nombre croissant de cellules germinales (Almeida et al., 2009; França et al., 2016, p. 20).

b. Le rôle des cellules de Sertoli ne se cantonne pas à la spermatogenèse

Les cellules de Sertoli sont primordiales tout au long de la spermatogenèse, mais elles sont aussi impliquées dans de nombreuses autres fonctions. Par exemple, chez les mammifères,

elles sécrètent des androgènes pour les cellules de Leydig, jouent aussi un rôle dans l'angiogenèse (Fan and al, 2011), la protection immunitaire (Washburn et al., 2022), le métabolisme du glutathion, sécrètent un fluide dans le lumen tubulaire ou phagocytent les résidus apoptotiques des cellules germinales ou des spermatozoïdes malformés (Almeida et al., 2009; Nakanishi and Shiratsuchi, 2004). Ces dernières fonctions pointent aussi le rôle central de ces cellules dans le « recyclage et la régulation des déchets ». Ces cellules s'illustrent dans 2 actions spécifiques. Au cours de la spermatogenèse, de nombreuses cellules germinales vont subir l'apoptose sans atteindre le stade de spermatozoïdes. L'ensemble des résidus apoptotiques seront alors phagocytés par les cellules de Sertoli et pourront être utilisés à des fins métaboliques (Voir section Métabolique) (Wang and Orban, 2007). Enfin le rôle des cellules de Sertoli sera clé lors de la spermiogenèse, dernière étape avant l'obtention de spermatozoïdes. Au cours de cette étape, les spermatides vont subir de nombreux changements structurels, comme une perte cytoplasmique contenant de nombreuses organelles. Ces pertes seront alors prises en charge par les cellules de Sertoli et seront dégradées. C'est d'ailleurs à partir de ces résidus apoptotiques des cellules germinales que les cellules de Sertoli vont pouvoir mettre en place des voies autophagiques. Riches en lipides, ces résidus vont être stockés sous forme de gouttelettes lipidiques qui seront utilisées a posteriori afin de fournir aux cellules germinales restantes l'énergie nécessaire à leurs développements (Voir section Lipophagie).

5. Relations avec d'autres types cellulaires

Comme évoqué précédemment, les cellules de Sertoli sont aussi en contact avec d'autres types cellulaires. Nous allons décrire 2 de ces types cellulaires, les cellules de Leydig et les Cellules Myéloïdes Périvitubulaires (PMC) ainsi que les liens que ces cellules possèdent avec les cellules de Sertoli.

a. Cellules de Leydig

Les cellules de Leydig ont pour rôle principal la sécrétion d'hormones, comme la testostérone, qui est essentiel pour la fertilité et la différenciation sexuelle (Zirkin and Papadopoulos, 2018). Chez la souris, dans le testicule à l'état fœtal, les cellules de Leydig expriment la protéine CYP17A1, qui induit la production d'un précurseur des androgènes, l'androstenedione. Il sera ensuite converti en testostérone dans les cellules de Sertoli par l'enzyme HSD17B3 (O'Shaughnessy et al., 2000). Cette régulation permet l'arrêt mitotique des gonocytes, nécessaire pour orienter la différenciation sexuelle mâle (Merlet et al., 2007).

Les cellules de Sertoli sont essentielles à la bonne conservation du nombre et des fonctions des cellules de Leydig. Des études faites sur la présence des cellules de Leydig en fonction d'un nombre décroissant de cellules de Sertoli ont montré qu'en présence de moins de cellules de Sertoli, les cellules de Leydig renaissent en apoptose (Rebourcet et al., 2014a; Ye et al., 2017).

Les cellules de Leydig sont donc centrales dans la mise en place de la spermatogenèse, en étroite collaboration avec les cellules de Sertoli. De façon intéressante, des études récentes ont pu mettre en évidence l'implication de la macroautophagie dans ces cellules, à la fois pour la sécrétion d'hormones (Gao et al., 2018), mais aussi dans l'importation de cholestérol (Ma et al., 2018). Des perturbations de l'activité autophagique auraient des conséquences directes sur la spermatogenèse.

b. Cellules myoïdes périvitubulaires (PMC)

Les PMC sont situées au niveau de la membrane basale des tubes séminifères. Elles possèdent des caractéristiques musculaires car elles sont capables de se contracter grâce à des flux de Ca^{2+} , ce qui aide au relargage des spermatozoïdes (Rebourcet et al., 2014b).

Les cellules de Sertoli jouent un rôle important dans la différenciation de ces PMC et dans la formation des tubes séminifères (Clark et al., 2000; Rebourcet et al., 2019). De plus, leurs actions permettent de conserver les fonctions contractiles de ces cellules dans le temps. L'équipe de Rebourcet a montré qu'une perte des cellules de Sertoli induisait une rigidification des PMC et limitait ainsi le relargage des spermatozoïdes dans les tubes séminifères chez les mammifères.

III. Régulation de la spermatogenèse

1. Hormonale

a. Gonadotrophines

Les gonadotrophines, comme la LH (Luteinizing Hormone) et la FSH (Follicle-Stimulating Hormone), sont des glycoprotéines hormonales qui sont sécrétées au niveau de l'hypophyse pour réguler la physiologie testiculaire. Ces hormones vont être reconnues par des récepteurs situés au niveau de la membrane plasmique des cellules de la gonade. La présence de LH permet la régulation de l'expression de stéroïdes via les cellules de Leydig alors que la FSH régule l'activité des cellules de Sertoli (Huhtaniemi and Themmen, 2005). Cependant, cette séparation n'est pas aussi présente chez les poissons téléostéens. De ce fait, on observe moins de divergences dans les activités biologiques de la FSH et de la LH. A partir de ces données, nous pouvons donc assumer que les fonctions des cellules de Sertoli sont principalement régulées par la présence de FSH (García-López et al., 2010). De plus, l'absence de LHR n'impacte ni le développement de la gonade, ni la fertilité chez le poisson zèbre (Chu et al., 2015, 2014; Zhang et al., 2015b, 2015a).

La FSH permet de stimuler les stades précoces de la spermatogenèse, comme la prolifération des spermatogonies (Campbell et al., 2003; Nóbrega et al., 2015; Ohta et al., 2007), alors que la présence de LH est plus impliquée dans les stades tardifs liés à la différenciation et à la maturation.

Des études transcriptomiques ont été réalisées sur des testicules de poissons zèbres afin de déterminer les gènes impactés en présence de FSH (Crespo et al., 2016). Au total, 119 gènes étaient stimulés et 87 réprimés. Les principales voies affectées étaient la voie de Wnt, Hedgehog ou encore les TGF- β (Transforming Growth Factor Beta). D'autres gènes liés à la sécrétion d'hormones, comme Dhh (Desert Hedgehog), Amh (Anti-Müllerian Hormone), Inha (INHibin A) ou Gsdf (Gonadal Somatic cell Derived Factor) étaient également affectés. Ce dernier, exprimé dans les cellules de Sertoli (Chen et al., 2013; Gautier et al., 2011) est notamment impliqué dans la prolifération spermatogoniale chez la truite (Sawatari et al., 2007).

Récemment, l'équipe de Shenming Zeng a pu mettre en évidence l'action de la FSH sur l'induction d'une activité autophagique dans les cellules de la granulosa de porc. La présence

de cette activité permet à ces cellules de produire de la progestérone, et cette production provient de la dégradation des gouttelettes lipidiques au sein de ces cellules, augmentant la quantité de cholestérol libre et favorisant ainsi la production de progestérone. (Liu et al., 2021).

b. Androgènes

En 1991, le groupe de Miura a mis en évidence que la présence d'une forme spécifique d'androgène, la 11-KetoTestostérone (11-KT) jouait un rôle important dans la mise en place de la spermatogenèse chez les poissons (Miura et al., 1991). Une des particularités des androgènes réside dans la distribution de leurs récepteurs : ils ne sont pas retrouvés dans l'ensemble des types cellulaires du testicule mature, mais seulement au niveau de la membrane des cellules de Sertoli (Ikeuchi et al., 2001). Cette hormone, la 11-KT, semble donc agir exclusivement sur ces cellules, sans que les cellules de Leydig soient touchées.

La présence d'androgènes va permettre la régulation de l'expression de nombreux gènes dans les cellules de Sertoli lors de la spermatogenèse (Le Gac et al., 2008). Parmi ces gènes, nous pouvons retrouver *DMRT1* (Doublesex- and mab-3-related transcription factor 1), qui est un facteur important dans la différenciation sexuelle et le développement du testicule et *SOX8* (Transcription factor SOX-8), impliqué dans la détermination sexuelle mâle.

Ces observations supportent donc l'idée que les androgènes jouent un rôle important dans le processus de spermatogenèse, et que leurs actions sont d'autant plus fortes dans les premiers stades de la spermatogenèse (division des spermatogonies). Lors des derniers stades, par exemple au moment de la spermiation, la présence des androgènes est moins importante, mais cette diminution est compensée par la présence de progestine, qui semble plus efficace (Ueda et al., 1985).

Néanmoins, même si ces androgènes sont capables de cibler directement des protéines et/ou des facteurs de transcription précis, ils peuvent aussi moduler l'activité autophagique, et inversement. En 2011, Li et al. ont pu observer dans les cellules de Leydig une diminution de la production de testostérone lorsque l'autophagie était chimiquement bloquée (Li et al., 2011). A l'inverse, des recherches sur les protéines liant les androgènes (ABP pour Androgen-Binding Protein) au niveau des cellules de Sertoli de rat ont montré une demi-vie plus longue en absence d'activité autophagique (Ma et al., 2015). Des données existaient déjà sur l'action de la testostérone sur la synthèse et la sécrétion de ces ABP (Ritzen et al., 1975), cependant elles n'avaient jusqu'alors pas démontré l'action inhibitrice de la testostérone sur l'autophagie (Ma et al., 2015). Cette inhibition permet alors aux ABP de ne pas être dégradées et de s'accumuler au sein des cellules de Sertoli.

c. Œstrogènes

L'œstradiol (également appelé E2) semble jouer un rôle important dans la régulation de différents gènes impliqués dans la spermatogenèse (Miura et al., 1999; Song and Gutzeit, 2003). Chez la truite, l'E2 induit la transcription de gènes qui codent pour des protéines de liaison au rétinol, ce qui fait de l'E2 une hormone régulatrice de l'AR dans les testicules (Schulz et al., 2009). Comme nous avons déjà pu en discuter, la présence d'AR induit la prolifération des spermatogonies (Zhou et al., 2008), et cette fonction a aussi été retrouvée chez le poisson zèbre,

où la présence d'AR permettait l'induction de la différenciation cellulaire des spermatogonies et l'entrée en méiose (Alsop et al., 2008 ; Pradhan and Olsson, 2015).

Chez l'anguille, il a aussi été constaté que l'E2 pouvait jouer un rôle au sein des cellules de Sertoli et induire la transcription de certains gènes (comme l'eSRS34 par exemple) pour mettre en place leur renouvellement, (Miura et al., 2007).

2. Le cytosquelette : lorsque la structure impacte la fonction

Comme nous avons pu le constater précédemment, les cellules de Sertoli jouent un rôle primordial dans la bonne mise en place mais aussi dans la régulation de la spermatogenèse. En plus des différents facteurs que nous avons pu évoquer, la structure même des cellules de Sertoli est aussi à prendre en compte durant ce processus. Pour leur permettre de remplir leur rôle dans les meilleures conditions, ces cellules ont besoin de modifications morphologiques et conformationnelles. Ces changements seront le résultat de leurs jonctions avec les cellules germinales afin de contribuer aux remodelages que subiront les spermatides (Vogl et al., 2014). Pour répondre au mieux à ces changements conformationnelles, les cellules de Sertoli possèdent un vaste et dynamique cytosquelette, composé de filaments d'actine, de filaments intermédiaires et de microtubules (Vogl et al., 2008).

Les filaments d'actine sont principalement situés au niveau des jonctions entre les cellules de Sertoli, mais aussi près des spermatides pendant la période d'élongation, jusqu'au moment de la spermiation, où les spermatides seront relarguées (Vogl et al., 2008). Les jonctions, formées de filaments d'actine, que l'on retrouve entre des cellules de Sertoli adjacentes forme une structure particulière connu sous le nom de « spécialisation ectoplasmique » (Russell and Peterson, 1985; Vogl et al., 2008). Cette structure est entrecoupée d'autres jonctions associées, comme les jonctions adhérentes, communicantes ou encore les jonctions serrées (Stanton, 2016; Vogl et al., 2014). Elles permettent surtout l'interaction entre cellules de Sertoli elles-mêmes, mais peuvent aussi se retrouver entre les cellules de Sertoli et les spermatides en élongation (Stanton, 2016). La présence de cette structure permet aussi aux cellules de Sertoli de délimiter le microenvironnement des cellules germinales (Kaur et al., 2014). Grâce à la présence de jonctions serrées, le passage de nombreuses molécules est limité, ce qui assure le bon développement de ces cellules dans une niche isolée de toute réaction immunologique (Kaur et al., 2014; Mital et al., 2011). Au cours de la spermatogenèse, les cellules de Sertoli sont capables de remodeler ces jonctions pour permettre le passage des spermatocytes dans la partie luminale du tubes séminifères, tout en conservant ce microenvironnement. Ce microenvironnement est maintenu par la régulation de ces filaments d'actine par de nombreuses protéines (N. Li et al., 2016).

Il existe également un réseau de microtubules qui interagissent avec les filaments d'actine de la spécialisation ectoplasmique pour permettre l'élongation mais aussi le transfert des spermatides dans le tube séminifère, jusqu'à leur libération durant la spermiation (Vogl et al., 2008). De plus, la présence de ces nombreux filaments d'actine joue aussi un rôle dans la forme finale de la tête des spermatides (Vogl et al., 2008). Une rupture de ces filaments au sein des cellules de Sertoli a montré une perte de l'adhésion entre ces cellules et les spermatides, menant à une baisse du nombre de jonctions adhérentes contenant de l'actomyosine. Ces fibres peuvent avoir des actions contractiles mais en absence de ces jonctions, la forme de la tête des spermatides est altérée (Sakamoto et al., 2018). Lors de la spermiation, les spermatides prêtes

à être libérées subissent des dernières modifications de remodelage par les cellules de Sertoli. Les spermatides restent maintenues aux cellules de Sertoli par des jonctions serrées dans un premier temps, afin de d'éliminer l'excédent de cytoplasme et constituer le flagelle, avant d'être libérés dans le tube séminifère (O'Donnell et al., 2011).

De manière plus générale, les cellules de Sertoli possèdent un abondant cytosquelette de microtubules (Vogl et al., 2008). Ces microtubules sont au cœur de la modulation de la forme des cellules de Sertoli afin de répondre aux besoins des cellules germinales au cours de leur développement (Russell et al., 1981; Vogl et al., 1983). Ces microtubules sont très présents au stade spermatide, contrairement aux premiers stades de développement des cellules germinales. Au cours de la spermatogenèse, les microtubules vont être au centre des translocations des spermatocytes et spermatides via leurs liaisons avec les filaments d'actine, mais aussi avec la spécialisation ectoplasmique (décrite plus haut). De par la présence de nombreuses kinésines et/ dynéines, qui viendront se fixer sur les microtubules pour permettre le déplacement de ces cellules, les microtubules permettent la fine régulation de l'emplacement de ces cellules en fonction de leur avancement dans la spermatogenèse.

3. Importance métabolique et rôles des mitochondries

L'apport d'énergie aux cellules germinales est primordial pour leur développement. En effet, une mauvaise régulation du métabolisme de ces cellules empêche toute différenciation et *in fine*, la mort de ces cellules (Nunnari and Suomalainen, 2012). Là encore, les cellules de Sertoli remplissent parfaitement leur rôle de cellules « nourricières », fournissant aux cellules germinales l'ensemble de l'énergie nécessaire à leur bon développement. Dans ce contexte, nous décrirons dans cette partie l'ensemble des mécanismes mis en place par les cellules de Sertoli afin de fournir l'énergie nécessaire aux cellules germinales ainsi que leurs impacts sur la spermatogenèse.

a. L'apport d'énergie des cellules de Sertoli

Tout d'abord, nous allons nous intéresser aux besoins énergétiques des cellules germinales, car ceux-ci vont être différents selon leurs stades de développement (Bajpai et al., 1998). Ces changements de besoins sont le résultat d'une restriction et de l'isolement de ces cellules germinales dans le testicule.. Chez les mammifères, les spermatogonies, qui sont en contact avec la lame basale, peuvent utiliser les nutriments présents dans le sang, et surtout du glucose afin de produire de l'ATP (Bajpai et al., 1998). Les spermatocytes, utilisent préférentiellement le pyruvate ou le lactate pour la production d'ATP (Bajpai et al., 1998; Nakamura et al., 1984). Pour les spermatides, il a été observé que le lactate (fourni par les cellules de Sertoli) était la source principale d'énergie et que sa simple présence permettait d'obtenir assez d'ATP dans ces cellules (Bajpai et al., 1998). . En plus de son rôle dans la mise en place de la spermatogenèse, le lactate permet de stimuler la synthèse d'ARN et de protéines dans les spermatides (Jutte et al., 1981) et possède un effet anti-apoptotique sur les cellules germinales (Erkkilä et al., 2002). Au sein des spermatozoïdes, des controverses demeurent quant à la l'importance relative de la glycolyse ou de l'activité mitochondriale dans la production d'énergie. Celle-ci semble compartimentée. La majorité de l'énergie proviendrait de la glycolyse, qui aurait lieu principalement au niveau de la flagelle. Toutefois, dans la partie centrale, l'énergie proviendrait de l'activité mitochondriale (Gómez et al., 2012).

b. Régulations métaboliques

Il apparaît que les régulations métaboliques se produisant au sein des cellules de Sertoli jouent un rôle fondamental lors de la spermatogenèse et donc dans la fertilité. Le métabolisme du glucose étant une des voies principales d'apport en énergie, elle présente quelques particularités dans les cellules de Sertoli. De plus, d'autres voies comme la voie des pentoses phosphates, ont montré une plus faible activité dans les cellules de Sertoli (Grootegoed et al., 1986; Robinson and Fritz, 1981). On peut donc en conclure que la majorité du glucose dans ces cellules est converti en pyruvate, puis va être pris en charge par la Lactate DeHydrogenase (LDH) pour le transformer en lactate (Fig. 23). Ce lactate sera ensuite sécrété afin de subvenir aux besoins des cellules germinales (Robinson and Fritz, 1981). De facto, cette production de lactate est limitée par la quantité de glucose présente dans les cellules de Sertoli. Ce glucose provient de l'environnement extracellulaire et est transporté, via des transporteurs spécifiques, dans les cellules de Sertoli. Ces transporteurs de glucose, de la famille des GLUTs (GLUcose Transporter), sont l'un des principaux régulateurs de la production de lactate (Angulo et al., 1998). Ce lactate est ensuite exporté par des transporteurs (MCT – MonoCarboxylate Transporter) situé au niveau de la membrane des cellules de Sertoli pour être importé dans les cellules germinales (Oliveira et al., 2012; Rato et al., 2015, 2012) (Fig. 23). La régulation de ces 2 types de transporteurs est l'une des clés dans le bon développement des cellules germinales via les cellules de Sertoli. Dans des conditions stressantes, comme la baisse de la concentration en glucose voire l'absence de celui-ci, les cellules de Sertoli adaptent leur métabolisme pour continuer à produire assez de lactate pour les cellules germinales. Dans ces

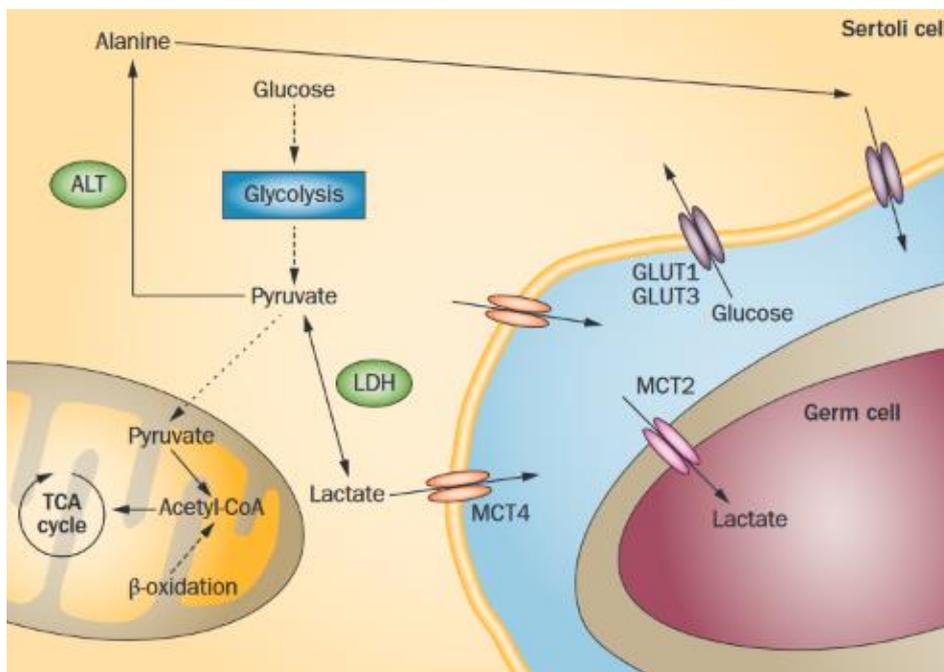


Figure 23 : Illustration schématique du métabolisme de la cellule de Sertoli (Rato and al, 2012)

Dans les cellules de Sertoli, le glucose va jouer un rôle central dans la production d'énergie. Ce glucose est directement importé de l'espace extracellulaire par des transporteurs de glucose (GLUTs). Au cours de la glycolyse, il sera transformé en pyruvate qui empruntera 2 voies majeures. La première repose sur la transformation du pyruvate en lactate par la Lactate Déshydrogénase (LDH). Ce lactate sera exporté par des canaux MCTs (MonoCarboxylate Transporter) vers les cellules germinales, qui permettront son import par ces mêmes canaux. La deuxième est l'utilisation de ce pyruvate dans le cycle de Krebs via sa transformation en Acetyl-CoA.

conditions, Galardo et al. ont observé l'activation de la voie AMPK (AMP-activated protein kinase), qui est assimilé à un senseur métabolique pour s'adapter à son environnement. Cette voie va permettre la bonne continuité de la synthèse de lactate en induisant une augmentation de la transcription des gènes des transporteurs GLUTs et MCTs (Galardo et al., 2007).

A contrario de leurs rôles de protecteurs et nourriciers, les cellules de Sertoli sont aussi capables d'induire l'apoptose des cellules germinales (Lee et al., 1997). Les cellules de Sertoli vont ensuite pouvoir phagocyter les résidus apoptotiques de ces cellules, les transformer en lipides pour les oxyder et produire de l'énergie (Lee et al., 1997). Au même moment, on peut aussi noter une augmentation de la transcription de long-chain acyl-CoA dehydrogenase, qui est nécessaire pour la dégradation des acides gras possédant une longue chaîne (Xiong et al., 2009). Cette capacité des cellules de Sertoli leur permet d'avoir une énorme réserve d'énergie à disposition si les cellules germinales ne sont pas capables d'assouvir leurs besoins énergétiques.

A ce jour, il existe de nombreux régulateurs afin de moduler le(s) métabolisme(s) présent(s) dans les cellules de Sertoli. Ils permettent de répondre au mieux aux besoins de ces cellules, mais également ceux des cellules germinales. Parmi ces régulateurs, nous pouvons retrouver la FSH (Oonk et al., 1989), l'insuline (Oliveira et al., 2012; Oonk et al., 1989), l'EGF (Epidermal Growth Factor) (Mallea et al., 1986), le bFGF (basic Fibroblast Growth Factor) (Schteingart et al., 1999), l'AMPK (Galardo et al., 2007) ou encore des hormones stéroïdiennes sexuelles (Oliveira et al., 2011; Rato et al., 2012).

La présence de FSH et d'insuline peuvent directement influencer la concentration de lactate en augmentant sa production (Oonk et al., 1989). La combinaison des 2 permet une production encore plus grande, même si leur effet n'est pas cumulatif. De plus, ces 2 hormones n'utilisent pas les mêmes voies pour la synthèse de lactate. Dans le cas où les cellules de Sertoli sont saturées par la FSH, ce qui n'induit plus une production de lactate, la présence d'insuline permet aux cellules de Sertoli de reprendre la production de lactate, et inversement. De plus, la présence de FSH et d'insuline ne changent pas la synthèse de nouvelles protéines requises dans la production de lactate. Cela suggère que seules l'activité enzymatique du métabolisme du glucose et/ou la régulation du transport de glucose sont impliquées. En ce sens, l'équipe de Silvia Socorro a découvert que l'absence d'insuline avait des conséquences sur la transcription de gènes liés à l'import de glucose, notamment sur le transporteur GLUT3 et GLUT1 (Oliveira et al., 2012).

Chez le rat, l'action de la FSH sur les cellules de Sertoli est multiple (Riera et al., 2001). Elle va permettre l'augmentation de l'import du glucose dans les cellules de Sertoli, avec des effets observables dès 30 minutes (Riera et al., 2001). Elle peut aussi induire une augmentation de l'activité enzymatique de la LDHA, produisant ainsi plus de lactate. Dans la continuité de son action sur l'activité de la LDHA, une augmentation de la transcription de ce gène a aussi été observée en présence de FSH dans ces cellules. En parallèle de ces actions, la FSH est capable, grâce à son interaction avec la PI3K (PhosphoInositide 3-Kinase), d'induire la translocation de GLUT1 à la membrane plasmique afin que les cellules de Sertoli absorbent davantage de glucose (Meroni et al., 2002). Elle peut également induire la transcription de gènes impliqués dans la glycolyse, comme la 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase (PFKFB), (Regueira et al., 2015). Enfin, la FSH est peut inhiber la transformation du pyruvate en acétyl-CoA via l'augmentation de l'expression de la pyruvate dehydrogenasekinase 3 (PDK3) (Regueira et al., 2015).

4. Autophagie

En plus des différents mécanismes présentés plus haut, de nombreuses études ont pu démontrer que l'autophagie, sous ses différentes formes, était présente et surtout nécessaire au bon déroulement de la spermatogenèse (Kirat et al., 2023; Wang et al., 2021).

a. Rôle de la mitophagie

Dans le but de maintenir l'homéostasie mitochondriale, il est nécessaire de trouver le bon équilibre entre la dynamique mitochondriale et la mitophagie (dégradation spécifique des mitochondries via l'autophagie). Cet équilibre permet de maintenir une bonne homéostasie cellulaire, la génération efficace d'énergie ou encore la régulation de l'apoptose (Wang and Wang, 2019). Même si cette dégradation implique les principaux facteurs de la macroautophagie, les mécanismes moléculaires mis en place dans la mitophagie présentent certaines spécificités. De manière générale, nous pouvons distinguer 2 principales voies de la mitophagie : celle dépendante de l'ubiquitine et celle indépendante de l'ubiquitine, qui mèneront à la liaison du LC3 au niveau de la membrane mitochondriale.

Dans le cas suivant, nous nous concentrerons sur la voie dépendante de l'ubiquitine, centrée autour des protéines PINK1 (protéine kinase mitochondriale) et PARKIN (E3 ligase cytosolique).

En situation basale (non stressée), PINK1 est importée au cœur de la mitochondrie après avoir traversé les membranes internes et externes via des transporteurs (Ding and Yin, 2012). Une fois dans la matrice, PINK1 va être clivée avant d'être dégradée par des peptidases mitochondriales (Ding and Yin, 2012). Lorsque les mitochondries sont endommagées, nous allons observer une baisse du potentiel membranaire des mitochondries, ce qui va empêcher la bonne translocation de PINK1 dans la matrice, son clivage et sa dégradation (S. Park et al., 2015). L'accumulation de PINK1 au niveau de la membrane externe des mitochondries va permettre l'activation de PINK1 par autophosphorylation (S. Park et al., 2015). Cette phosphorylation va entraîner le recrutement de PARKIN et induire son activité ligase. Ceci entraîne la production de nombreuses chaînes poly-ubiquitinées, qui vont être reconnues par des « récepteurs autophagiques », comme la protéine p62 (Nguyen et al., 2016). Cette reconnaissance va induire le transfert de ces mitochondries au niveau des autophagosomes pour la dégradation de celles-ci (Nguyen et al., 2016).

Au cours des dernières étapes de la spermatogenèse, lors de la spermiogenèse, les spermatozoïdes vont subir de nombreux changements conformationnels, comme la mise en place de l'acrosome chez les mammifères, la formation du flagelle ou encore la condensation du noyau (Sakai and Yamashina, 1989). Durant ces événements, l'élimination de l'excès de mitochondries dans les vésicules résiduelles permet le réarrangement des mitochondries restantes (Huang et al., 2021, p. 202; Sakai and Yamashina, 1989). La mitophagie semble donc être une voie importante dans la bonne maturation des spermatides, et certaines protéines clés dans la mise en place de cette fonction impactent cette maturation.

En 2016, l'équipe de Shang a pu mettre en évidence que l'absence du gène *Atg7*, qui possède un rôle central dans la mise en place de la macroautophagie, spécifiquement dans les spermatides impactait à la fois la morphologie finale du spermatozoïde, mais aussi leur capacité

à se déplacer (Shang et al., 2016). En plus de ces observations, ils ont pu démontrer que le flagelle de ces spermatozoïdes présentait des différences morphologiques (comme la perte de la structure de l'axonème en 9+2). Dans ces flagelles, de nombreuses mitochondries ont été retrouvées dans la partie terminale du spermatozoïde et non condensées, ce qui a causé une perte de la motilité de ces spermatozoïdes, et ainsi une perte de leur capacité de fertilisation. De même, dans des cellules germinales qui n'exprimaient plus le gène *Atg5*, ces résultats ont pu être confirmés (Huang et al., 2021). La perte de cette activité autophagique a mené à des conséquences très proches de celles observées dans les cellules germinales n'exprimant plus *ATG7* : une différenciation anormale des spermatides, un acrosome mal formé, un mauvais réarrangement mitochondrial.

D'après ces données, une altération de ces voies peut entraîner une mauvaise spermatogenèse, pouvant aboutir à l'infertilité. C'est ce cas précis qui a été observé chez la drosophile, avec des mutations sur le gène *Parkin* qui a entraîné une perte de fonction de cette protéine (Greene et al., 2003). Cette protéine est aussi connue pour être la cause d'une forme précoce de la maladie de Parkinson, le parkinsonisme juvénile autosomique récessif (Greene et al., 2003). Lorsque cette équipe s'est intéressée à la structure des testicules et des cellules germinales pour comprendre cette infertilité, ils se sont rendus compte que dans les derniers stades de développement des spermatozoïdes, les cellules germinales ne s'individualisaient pas (Greene et al., 2003). Au cours de ce processus, l'analyse de la structure des flagelles a été étudiée. Même si aucune différence significative a été observée dans l'axonème, une perturbation au niveau de la formation de la Neberkern a été notée. La Neberkern, chez les insectes, consiste en une accumulation et une fusion des mitochondries, qui *in fine* va venir former 2 mitochondries entrelacées (Hales and Fuller, 1997). Dans le cas des mutants *PARKIN*, l'intégrité de cette Neberkern n'est pas assurée, pouvant mener à la formation de plusieurs de ces structures, ou à l'inverse seulement une plus petite, résultant d'un défaut dans la fission de ces mitochondries ou une sur fusion de celles-ci lors de l'élongation des spermatides.

Une induction de la mitophagie et aussi retrouvée dans le spermatozoïde des patients atteints de cryptorchidie. Cette maladie correspond à une mauvaise migration des testicules, qui restent bloqués soit dans le canal inguinal, soit dans la cavité abdominale. Dans les spermatozoïdes de ces patients, une forte activité autophagique a été détectée, probablement provoquée par la forte température de l'environnement autour de ces testicules. Des études de la composition des vésicules autophagiques ont révélé la présence de mitochondries dégradées en leur sein, prouvant la présence d'une activation de la mitophagie. La prise en charge de ces mitochondries par le processus autophagique peut résulter de la hausse de la température, induisant une production plus importante de ROS dans la matrice et des dommages de la membrane mitochondriale. Ces observations ont été confirmées par l'absence de p62 dans ces spermatozoïdes, signe de l'activation de l'autophagie (Aparicio et al., 2016). Des observations en microscopie électronique ont également pu mettre en évidence des anomalies dans la conformation des mitochondries autour de l'axonème, mais aussi dans leur positionnement (Yefimova et al., 2019).

Enfin, chez la plupart des espèces, afin d'empêcher la présence d'hétéroplasmie (présence des génomes mitochondriaux maternel et paternel dans une même cellule), une diminution de la quantité des mitochondries est observée au cours du processus de spermatogenèse et mettrait en jeu l'autophagie. En ce sens, l'absence de cette fonction, chez des médaka mutants n'exprimant

plus EPG-5 (Ectopic PGL Granules-5), entraîne une perte de la diminution du nombre de mitochondries (Herpin et al., 2015).

Quel que soit l'espèce étudiée, les processus autophagiques restent centraux dans le bon déroulement de la spermatogenèse, et ces résultats soulignent leurs importances lorsque les cellules germinales atteignent les derniers stades de maturation. Ces voies sont donc clés au moment du relargage des spermatozoïdes dans le tube séminifère et dans la bonne activation de ceux-ci.

b. Rôle de la réticulophagie

Le réticulum endoplasmique (RE) joue un rôle central dans la synthèse, la conformation et le transport de nombreuses protéines à travers la cellule (Schwarz and Blower, 2016). En situation de stress, (oxydatif, toxines...), des protéines endommagées ou de conformation anormale s'accumulent dans le RE et induisent la réponse UPR (unfolded protein response). Chez les mammifères, la réponse UPR induit une cascade d'évènement incluant l'activation de la transcription de gènes du stress, une profonde inhibition de la traduction et la dégradation par le protéasome ERAD (endoplasmic reticulum-associated degradation) des protéines concernées (protéines endommagées ou de conformation incorrecte). Ce mécanisme permet de conserver l'intégrité du RE (Omura et al., 1967). Cependant, lorsque ces stress perdurent, la réponse UPR et les mécanismes associés ne suffisent pas, et la cellule induit une dégradation par autophagie du RE (un processus appelé ER-phagy ou réticulophagie) (Qi and Chen, 2019). Ce mécanisme va permettre la dégradation de fragments spécifiques du RE qui seront endommagés et qui présenteront des marqueurs à leur surface, comme la protéine p62 ou encore FAM134B (Chino and Mizushima, 2020).

Récemment, une étude a pu mettre en évidence l'effet d'un stress du RE sur la spermatogenèse, et l'implication possible de la réticulophagie (ou du moins de la macroautophagie) dans cet effet (Chang et al., 2019). En effet, les auteurs de cette étude ont démontré qu'une déficience en TBC1D20 (un gène impliqué dans la maturation des autophagosomes) induit l'apoptose des cellules de Sertoli en déclenchant un stress irréversible du réticulum endoplasmique chez la souris, contribuant in fine à une infertilité.

c. Rôle de la lipophagie

Les gouttelettes lipidiques sont des réserves d'énergie présentes dans la cellule, principalement constituées de triglycérides et d'ester de cholestérol, et recouvertes d'une couche de phospholipides à la surface (Fujimoto and Parton, 2011). Leur dégradation permet la mobilisation du métabolisme des lipides, apportant de l'énergie aux cellules (Fujimoto and Parton, 2011). Cette dégradation peut s'effectuer de 2 manières différentes : la lipolyse et la lipophagie. La première demande la présence de lipases pour libérer les acides gras des gouttelettes lipidiques. La deuxième, met en jeu la machinerie autophagosomale (Singh et al., 2009). La reconnaissance de ces gouttelettes lipidiques s'effectue par le biais de la protéine p62, qui va servir d'intermédiaire entre ces gouttelettes et l'autophagosome formé (Münz, 2017). Cette forme de lipophagie est aussi appelée macrolipophagie. Quelle que soit la voie impliquée (lipolyse et macrolipophagie), la CMA semble être nécessaire à la première étape de dégradation des gouttelettes lipidiques (Kaushik and Cuervo, 2015). En effet, la CMA permet

la dégradation des protéines PLIN 2 et 3 situées à la surface des gouttelettes lipidiques, ce qui facilite ensuite l'accès des lipases ou de la machinerie autophagosomale pour la dégradation de ces gouttelettes. Cependant, à ce jour, aucun lien clair n'a été établi entre la présence de la CMA et son implication dans la spermatogenèse. Nous nous concentrerons donc uniquement sur l'impact de la macrolipophagie sur le processus de la spermatogenèse.

Ce processus est utilisé par les cellules de Sertoli afin de produire et d'exporter l'énergie vers les cellules germinales pour maintenir leur bon développement (Ahmed et al., 2016). Dans les cellules de Sertoli du rat, en fonction de l'avancée dans le processus de spermatogenèse, des quantités différentes de gouttelettes lipidiques au sein de ces cellules ont pu être observées (Kerr et al., 1984). Dans les stades tardifs de la spermatogenèse, la quantité de gouttelettes lipidiques, mesurées à la fois en surface et en volume dans les cellules de Sertoli, s'est révélée être beaucoup plus importantes que pour les stades précoces. Cette observation corrobore l'idée de la dégradation de ces gouttelettes dans le temps. Au moment de la spermiation, les cellules de Sertoli vont favoriser la synthèse de ces gouttelettes lipidiques en prévision du prochain cycle spermatogénique. Ces grandes quantités de lipides vont ensuite être dégradées lors du début de la prochaine spermatogenèse, permettant le bon apport d'énergie pour le développement des cellules germinales (Ahmed et al., 2016; Kerr et al., 1984). La mise en place de ces stocks nécessite donc la bonne communication entre les cellules de Sertoli et les cellules germinales. Une autre action de la lipophagie a lieu lors de la phagocytose, par les cellules de Sertoli, des vésicules résiduelles des spermatides ou encore des corps apoptotiques des cellules germinales (Wang et al., 2006). Au cours de la spermatogenèse, plus de la moitié des cellules germinales peuvent subir l'apoptose et les résidus sont pris en charge par les cellules de Sertoli (Kerr et al., 1984). L'ensemble de ces lipides va alors être stocké sous la forme de gouttelettes lipidiques, qui serviront ensuite à la production d'énergie pour les cellules de Sertoli et pour les cellules germinales (Wang et al., 2006, p. 200; Xiong et al., 2009).

L'autre apport de la lipophagie au cours de la spermatogenèse repose sur son rôle dans la production de testostérone. En plus de jouer un rôle dans les cellules de Sertoli, cette fonction est aussi présente dans les cellules de Leydig. Ces cellules, comme décrites précédemment, jouent un rôle central dans la production d'androgènes, et plus particulièrement de testostérone. Les gouttelettes lipidiques étant composées de nombreux ester de cholestérol, la lipophagie va donc permettre de libérer de grandes quantités de cholestérol dans la cellule, substrat principal dans la synthèse de testostérone (Tarique et al., 2019). Ce cholestérol va se lier à la protéine STAR (Steroidogenic Acute Regulatory protein), qui va induire sa translocation au niveau de la mitochondrie et permettre ainsi la synthèse de testostérone. La testostérone est une hormone très importante dans le processus de spermatogenèse, la relation entre sa présence et celle de la lipophagie intéresse de plus en plus de chercheurs. Dans ce contexte, des cellules de Leydig de rat ont été cultivées in-vitro et après avoir bloqué les voies autophagiques, en utilisant soit des réactifs chimiques ou des petits ARN interférents (siRNA), l'équipe de Ma a pu mettre en évidence une perte de la production de testostérone (Ma et al., 2018). En parallèle de ces observations, ils ont pu noter une augmentation du nombre de gouttelettes lipidiques dans les cellules de Sertoli, mais aussi une diminution de la quantité de cholestérol libre dans ces cellules. L'absence de la production de testostérone par ces cellules va directement impacter la fertilité (Yang et al., 2017).

OBJECTIFS

Objectifs

Depuis sa découverte par l'équipe de Fred J Dice à la fin des années 1980, la CMA a longtemps été considéré n'être spécifique que des mammifères et des oiseaux, faute d'avoir identifié d'autres espèces capables d'exprimer la protéine LAMP2A (facteur limitant de la CMA). Toutefois, des preuves fonctionnelles de l'existence d'une activité CMA ont été récemment apportés chez les poissons (Lescat et al., 2020 ; Velez et al., 2023), apportant des changements conceptuels importants dans notre compréhension de l'histoire évolutive de la CMA, et ouvrant de nouvelles perspectives en recherche, notamment en permettant l'utilisation de modèles animaux complémentaires, tels que le poisson zèbre, pour approfondir nos connaissances sur les mécanismes régissant cette fonction.

Dans ce contexte, l'objectif de cette thèse était double. Dans un premier temps, éclaircir l'histoire évolutive de la CMA et de sa voie apparentée appelée eMi. Dans ce but, nous avons mené une analyse exhaustive des informations actuellement disponibles sur l'existence et l'évolution des principaux acteurs nécessaires à la mise en place et la régulation de ces deux fonctions, avec un focus particulier sur la protéine LAMP2A.

Le second objectif de cette thèse était de déterminer si le poisson zèbre possédait une activité CMA. , L'enjeu ici était de déterminer dans quelle mesure cette espèce, reconnue comme étant un modèle animal incontournable dans la recherche scientifique, peut être utilisée pour améliorer nos connaissances sur la régulation et le rôle de la CMA. Les données obtenues ont permis de révéler un rôle de la CMA, jusque-là inconnu, dans la spermatogenèse.

Au cours de ce travail de thèse, les résultats obtenus ont abouti à deux publications (une acceptée et une prochainement soumise).

Publication 1:

Schnebert*, S.; **Goguet*, M.**; Vélez*, E.J.; Depincé, A.; Beaumatin, F.; Herpin, A.; Seiliez, I. « Diving into the Evolutionary History of HSC70-Linked Selective Autophagy Pathways: Endosomal Microautophagy and Chaperone-Mediated Autophagy ». *Cells* 2022, 11, 1945.

* Ces auteurs ont contribué de manière équivalente

Publication 2:

Maxime Goguet, Emilio J Vélez, Simon Schnebert, Karine Dias, Vincent Véron, Alexandra Depincé, Florian Beaumatin, Amaury Herpin, Iban Seiliez. « Chaperone-mediated autophagy regulates spermatogenesis: new insights from zebrafish ».

Ces résultats ont aussi été présentés lors de congrès nationaux et internationaux :

- Simon Schnebert, **Maxime Goguet**, Emilio J Vélez, Beth Cleveland, Amaury Herpin, Iban Seiliez “Fishing for new tools to study Chaperone-Mediated Autophagy”. Women in Autophagy, 2nd Annual Symposium Webinar, 22-23 Novembre 2021, New-York (USA) – Flash Talk & Poster
- **Maxime Goguet**, Alexandra Depincé, Vincent Véron, Amaury Herpin, Iban Seiliez « Chaperone-Mediated Autophagy : Zebrafish joins the dance ». Journée du Club d’Autophagie Bordelais (CAB), 8 Avril 2022, Bordeaux (France) – Présentation orale
- **Maxime Goguet**, Alexandra Depincé, Vincent Véron, Amaury Herpin, Iban Seiliez « Chaperone-Mediated Autophagy : Zebrafish joins the dance ». Club Francophone de l’Autophagie (CFATG), 31 Mai 2022, Besançon (France) – Présentation orale
- **Maxime Goguet**, Simon Schnebert, Emilio J Vélez, Alexandra Depincé, Amaury Herpin, Iban Seiliez « Chaperone-Mediated Autophagy : Zebrafish joins the dance ». Autophagy UK Network Meeting, 19-20 Juillet 2023, Birmingham (UK) -- Poster

Publication 1:

Diving into the Evolutionary History of HSC70-Linked Selective Autophagy Pathways: Endosomal Microautophagy and Chaperone-Mediated Autophagy

Objectifs :

Cette revue avait pour objectif de retracer l'histoire évolutive des différents acteurs de la CMA et de l'eMI, mais aussi de noter les divergences observées entre espèces afin de mieux comprendre ces fonctions et leurs interactions.

Principaux résultats :

- La plupart des protéines et éléments fondamentaux de l'eMI sont très certainement déjà en place dès les premières étapes de l'évolution eucaryote, bien que la preuve fonctionnelle de l'eMI n'ait été apporté que pour la drosophile et la souris.
- Le gène *LAMP2* est apparu plus tardivement, lors de la radiation des vertébrés, indiquant que la CMA est spécifique des vertébrés.
- Les différences de séquences au niveau des domaines fonctionnels de la protéine Lamp2A entre différentes espèces suggèrent la possibilité d'une évolution dans son rôle cellulaire et/ou physiologiques.

Conclusions :

Ces résultats soulèvent de nouvelles questions quant à la coexistence possible, chez les vertébrés, de deux voies protéolytiques étroitement liées (la CMA et l'eMI) qui ciblent le même groupe de protéines substrats et font appel à la même chaperonne, la HSC70.

Dans l'ensemble, cette analyse met en évidence la présence du gène *LAMP2* chez l'ensemble des vertébrés, et suggère que la fonction CMA (telle que décrite actuellement) serait présente uniquement dans cette lignée. Cependant, les différences au sein de la séquence et de la structure de LAMP2A chez différentes espèces suggèrent de possibles changements dans les fonctions physiologiques et cellulaires au cours de l'évolution.

Review

Diving into the Evolutionary History of HSC70-Linked Selective Autophagy Pathways: Endosomal Microautophagy and Chaperone-Mediated Autophagy

Simon Schnebert ^{1,†}, Maxime Goguet ^{1,†}, Emilio J. Vélez ^{1,†}, Alexandra Depincé ², Florian Beaumatin ¹, Amaury Herpin ^{2,*} and Iban Seiliez ^{1,*}

¹ E2S UPPA, INRAE, NUMEA, Université de Pau et des Pays de l'Adour, 64310 Saint-Pée-sur-Nivelle, France; simon.schnebert@inrae.fr (S.S.); maxime.goguet@inrae.fr (M.G.); emilio-jose.velez-velazquez@inrae.fr (E.J.V.); florian.beaumat@inrae.fr (F.B.)

² UR1037 Laboratory of Fish Physiology and Genomics, Campus de Beaulieu, INRAE, F-35042 Rennes, France; alexandra.depince@inrae.fr

* Correspondence: amaury.herpin@inrae.fr (A.H.); iban.seiliez@inrae.fr (I.S.)

† These authors contributed equally to this work.

Citation: Schnebert, S.; Goguet, M.; Vélez, E.J.; Depincé, A.; Beaumatin, F.; Herpin, A.; Seiliez, I. Diving into the Evolutionary History of HSC70-Linked Selective Autophagy Pathways: Endosomal Microautophagy and Chaperone-Mediated Autophagy. *Cells* **2022**, *11*, 1945. <https://doi.org/10.3390/cells11121945>

Academic Editor: Takahiro Seki

Received: 29 May 2022

Accepted: 15 June 2022

Published: 16 June 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Autophagy is a pleiotropic and evolutionarily conserved process in eukaryotes that encompasses different types of mechanisms by which cells deliver cytoplasmic constituents to the lysosome for degradation. Interestingly, in mammals, two different and specialized autophagic pathways, (i) the chaperone-mediated autophagy (CMA) and (ii) the endosomal microautophagy (eMI), both rely on the use of the same cytosolic chaperone HSPA8 (also known as HSC70) for targeting specific substrates to the lysosome. However, this is not true for all organisms, and differences exist between species with respect to the coexistence of these two autophagic routes. In this paper, we present an in-depth analysis of the evolutionary history of the main components of CMA and eMI and discuss how the observed discrepancies between species may contribute to improving our knowledge of these two functions and their interplays.

Keywords: chaperone-mediated autophagy; CMA; LAMP2A; HSC70; KFERQ; endosomal microautophagy; eMI; evolution

1. Introduction

In the late 80s, Fred J Dice's work was pioneered when it first described a lysosomal pathway selectively degrading soluble proteins [1]. At that time, selectivity in lysosomal degradation had not yet been established or even considered. This notion has since gained ground, and the mechanism that Fred J Dice discovered is nowadays known as chaperone-mediated autophagy (CMA, Figure 1). In detail, during this process, cytosolic proteins containing a pentapeptide sequence sharing biochemical similarity to KFERQ (lysine-phenylalanine-glutamate-arginine-glutamine) are first recognized by the heat-shock protein family A [Hsp70] member 8 (HSPA8/HSC70) and co-chaperones (including Hsp90, Hsp40, the Hsp70-Hsp90 organizing protein (Hop), the Hsp70-interacting protein (Hip), and the Bcl2-associated athanogene 1 protein (BAG-1)) [2,3]. The substrate-chaperone(s) complex then docks at the lysosomal membrane through a specific binding to the cytosolic tail of the lysosomal-associated membrane protein 2A (LAMP2A), which is considered to be the rate-limiting and essential protein for CMA [4]. LAMP2A then organizes into a multimeric complex that allows substrates to translocate across the lysosomal membrane [5,6], where they are ultimately degraded by acid hydrolases. Beyond these primary modalities, in recent years, many research efforts have been carried out to decipher the ins and outs of how the pleiotropic physiological function(s) of CMA exert and are regulated to obtain specificity

[7]. Hence, recent findings emphasized the fundamental role(s) of CMA in regulating numerous cellular functions, including cellular energetics, transcriptional programs, cell death, cell survival mechanisms, and even DNA repair, whose main players harbor one or more KFERQ domains.

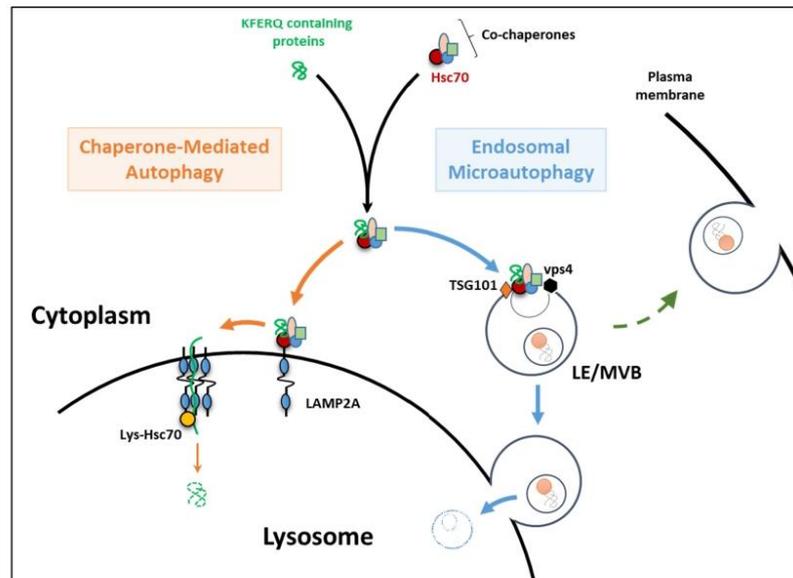


Figure 1. Chaperone-mediated autophagy (CMA) and endosomal microautophagy (eMI) as described in mammals. The first step (dark arrows) of recognition of the KFERQ motif-containing proteins by HSC70 and its co-chaperones is shared by both pathways. During CMA (orange arrows), the substrate-chaperone complex is then directed to the lysosomal membrane through specific binding to the cytosolic tail of the lysosomal-associated membrane protein 2A (LAMP2A). LAMP2A then organizes into a multimeric complex that allows substrates to translocate across the lysosomal membrane and reach the lumen for degradation by lysosomal hydrolases. During eMI (blue arrows), the substrate-chaperone complex is transported to late endosomes/multivesicular bodies (LE/MVB) by direct binding of HSC70 to phosphatidylserine residues on the LE/MVB membrane. Members of the ESCRT machinery (including VPS4 and TSG101) will then mediate the internalization of the substrate into intraluminal vesicles. eMI substrates may then be degraded within the LE/MVB itself or upon their fusion with a lysosome. Alternatively, eMI could mediate extracellular protein releases due to the ability of LE/MVB to fuse with the plasma membrane (green dashed arrow).

Very recently, along with the emergence of new concepts in the field of autophagy, Sahu et al. evidenced that KFERQ domain-containing proteins can additionally be subjected to parallel degradation in late endosomes/multivesicular bodies (LE/MVB) through a pathway referred to as endosomal microautophagy (eMI) [8]. This alternative process contributes to the in bulk degradation of cytosolic proteins trapped in vesicles forming at the LE membrane. Interestingly, some proteins bearing a KFERQ domain can also be selectively recognized and degraded by eMI through a LAMP2A-independent mechanism but are in need of the “Endosomal Sorting Complex Required for Transport” (ESCRT) machinery (Figure 1) [9].

Briefly, after being recognized by HSC70 (a common step between CMA and eMI), the substrates targeted by eMI are then transported to the LE/MVB after the direct binding of HSC70 to phosphatidylserine residues on the LE/MVB membrane [10]. Members of the ESCRT machinery, including VPS4 and TSG101, then gather around this area and form a

membrane invagination internalizing the substrate into intraluminal vesicles [8]. eMI substrates might then be degraded either within the LE/MVB itself (i.e., Tau [11]) or upon subsequent fusion with a lysosome [8,11]. Alternatively, eMI could also act as a gateway for extracellular protein release due to the ability of LE/MVB to fuse with the plasma membrane and release their luminal content (exosomes) [12]. However, in this latter case, the fate of the cargo is different. Thus, it has been proposed to use the term eMI only for cytosolic proteins loaded in the LE/MVB that undergo degradation in this compartment or during lysosomal fusion and not for those targeted for extracellular release by exocytosis [9]. The characterization of the eMI now raises several questions about the relationship and interplay between CMA and eMI. In particular, the mechanisms underlying the routing of KFERQ-containing substrates to one or the other of these degradation pathways remain to be determined. The respective roles and functional complementarities/overlapping/compensation of these pathways also need to be considered.

Notwithstanding, to date, the co-existence of these two autophagic pathways has only been demonstrated in mammals, and factually, this scenario does not seem to apply to all species. Indeed, the recent discovery that the *LAMP2* gene (encoding LAMP2A) emerged at the root of the vertebrate lineage [13] indicates that invertebrates are de facto unable to perform any mammalian-type of CMA activity [7], or at least a LAMP2A-dependent CMA process such as that recently described in fish [13]. As such, although flies (*Drosophila melanogaster*) appear to be a CMA-incompetent species, they nevertheless perfectly cope with eMI only [14], meaning that eMI could fulfill all the functions shared with CMA in mammals. Interestingly, in fission yeast (*S. pombe*), Liu et al. reported the existence of an ESCRT-dependent eMI-like process that relies on the NBR1 protein (which shares a partial homology with the mammalian macroautophagy receptor NBR1) to deliver two hydrolytic enzymes (LAP2 and APE2) from the cytosol to the vacuole [15]. However, unlike the eMI process described in mammals and *D. melanogaster*, the yeast alternative, termed NBR1-mediated vacuolar targeting (NVT), singularly relies on the ubiquitination of NBR1 and/or its associated proteins and not on HSC70, suggesting that NVT and eMI are indeed two distinct mechanisms. Considering this data, it is tempting to build a scenario in which eMI and CMA would have appeared sequentially during the course of evolution. The oldest eukaryotic lineages would be eMI- and CMA- incompetent, invertebrates (ecdysozoans and lophotrochozoans) would barely perform eMI, and only vertebrates would use both of the pathways, eMI and CMA. To go a step further, the apparent sequence variability of LAMP2A in vertebrates (particularly in its cytosolic C-terminal region that is involved in substrate-chaperone complex recognition) between phylogenetically distant species [16] additionally addresses the possibility of a still ongoing evolution of the mechanisms underlying CMA activity across vertebrates.

In the present review, we summarized the current understanding of the evolutionary history of the main components necessary for CMA and eMI functions and discussed how the observed disparities between species can improve our knowledge of these two functions and their interplays from an evolutionary perspective.

2. The Essentials of eMI and CMA

2.1. The KFERQ Motif

A common and essential step between eMI and CMA is the recognition by HSC70 of the KFERQ-like motif-containing proteins. The existence of either of these processes (eMI or CMA) in a given species, therefore, requires the presence of proteins bearing this motif or, at least, a sequence related to this motif, but how was this motif defined? Pioneering studies performed by Fred J Dice using bovine pancreatic ribonuclease A (RNase A) initially identified an 11-amino acid region within the protein, and later on, this motif was narrowed down to the pentapeptide KFERQ, which is necessary and sufficient to target proteins for lysosomal degradation [16]. However, the exact sequence, -KFERQ-, is only contained in RNase A. Further

studies conducted by the same team also demonstrated that the physical properties of the residues constituting the motif, rather than the specific amino acids per se, determine the ability of the chaperone HSC70 to bind this region [17]. Accordingly, these authors defined that a canonical KFERQ-like motif is always flanked by a glutamine (Q) on either side and must contain (i) one or two of the positive residues K and R, (ii) one or two of the hydrophobic residues F, L, I, or V, and (iii) one of the negatively-charged residues E or D (Figure 2). Recently, other studies have demonstrated that KFERQ-like motifs can be generated via post-translational modifications. Thus, phosphorylation or acetylation of the amino acid residues along protein regions that do not originally display the mentioned properties dramatically increases the repertory of putative HSC70 substrates (Figure 2) [18–20].

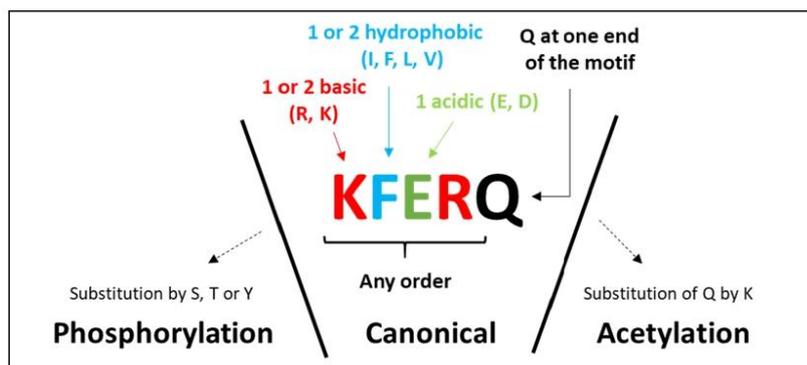


Figure 2. Building rules of canonical, phosphorylation-, and acetylation-generated KFERQ-like motifs (adapted from [21]). The KFERQ-like motif may contain up to two hydrophobic residues (isoleucine (I), phenylalanine (F), leucine (L), or valine (V)), up to two positive residues (arginine (R) or lysine (K)), and a single negatively-charged residue (glutamate (E) or aspartate (D)) flanked at either the N- or C-terminus of the pentapeptide by a single glutamine (Q) residue. KFERQ-like motifs can also be generated via post-translational modifications, such as phosphorylation or acetylation of the amino acid residues along protein regions that do not originally show the mentioned properties.

According to the above-described definition of the KFERQ-like motif, approximately 46% of proteins in human proteome contain at least one canonical motif, 20% contain no canonical motif but a phosphorylation-generated one, and 9% contain only acetylation-generated motifs [22]. Interestingly, the overall percentages of proteins bearing each of the KFERQ-like-types motifs are similar between the proteome of *Mus musculus* (which is both CMA- and eMI-competent), *Drosophila melanogaster* (which is eMI-competent but CMA-incompetent), and *Saccharomyces cerevisiae* (unable to perform CMA and whose ability to perform a “mammalian-type” eMI has not been demonstrated) [22]. These results suggest that the emergence of the KFERQ-like motif most likely preceded the establishment of the CMA function (and possibly that of eMI as well) and that the proportion of these proteins in the proteome of a given species is thus not predictive of its ability to perform any of these selective autophagy pathways. Nonetheless, a recent comparison of more than 500 orthologs of human proteins harboring a single canonical KFERQ motif in 50 different species predicted to be either CMA-competent or -incompetent, revealed that about 45% of the investigated proteins displayed a more preserved motif in “CMA-proficient” species than in “CMA-deficient” ones [22]. This suggests a substantial degree of evolution of this motif in different species. Whether the evolution of this region is dependent on their ability to perform either eMI, CMA, or both remains to be further investigated.

2.2. HSC70

The chaperone HSC70, a member of the heat shock protein 70 family (HSP70), is mostly constitutively expressed. It is involved in diverse cellular processes, including protein folding and protein degradation. We do not intend here to give a detailed description of all the various functions fulfilled by this protein. It has already been well described in excellent reviews that we encourage to consult [23–25]. Instead, we will rather discuss the evolutionary history of this chaperone and draw up a scenario that highlights how the two autophagic functions (eMI and CMA) might have specifically evolved, although using/sharing an initial common component.

Proteins of the HSP70 family appeared very early during evolution and are found in a wide range of living organisms, from archaea to mammals [26–28]. Interestingly, significant differences in the number of genes belonging to this family are clearly visible between species. Thus, a recent screen for the presence of HSP70 in 5551 representative prokaryotic genomes revealed that the number of HSP70 genes in individual prokaryotic genomes ranges from 0–23 (99.1% of the genomes contain at least one HSP70 gene) [29]. Similarly, it is well known that most eukaryotic cells also display several genes coding for HSP70/HSC70 proteins. For example, the yeast *Saccharomyces cerevisiae* has more than 10 genes coding for proteins of this family [30], which have all been shown to present both overlapping and divergent functions [31]. Furthermore, at least 12 genes encoding 14 proteins of the HSP70 family are found in the human genome [23]. Although all of them display an overall high sequence identity (more than half share 80% of their amino acid sequence), these proteins are nevertheless likely involved in distinct functions due to, notably, specific spatio-temporal distributions [23].

Most of the HSP70 family members are cytosolic proteins. They have further been classified into either inducible HSP70s or constitutively expressed HSC70s, but until recently, their evolutionary relationship remained elusive, mainly due to the lack of cross-phylum comparisons. However, a recent in-depth phylogenetic study reviewing 125 complete HSP70/HSC70s genes from a wide range of species across different phyla has clarified the complex evolution of this gene family [32]. According to this study, HSP70 family members associate with mitochondria and the endoplasmic reticulum form two monophyletic groups (Figure 3). Members of the cytosolic HSP70 family form a third monophyletic group, which also includes yeast cytosolic HSP70s (with both inducible and constitutive *ssa1–4* genes). Within metazoan cytosolic HSP70/HSC70s, two large lineages are distinct. These two lineages most certainly formed before the separation of vertebrates and invertebrates. One lineage includes a relatively limited number of genes from many invertebrate phyla, none of which have been shown to be constitutively expressed. The second lineage contains both inducible and constitutive genes from various phyla. This second lineage has further diversified within some phyla (including at least *Platyhelminthes*, *Rotifera*, *Nematoda*, and *Chordata*). In this regard, some genes from the second lineage have certainly either gained or lost their stress-inducible response capacity (through convergent evolution), which may explain the sporadic distribution of “HSP70” and “HSC70” in previous phylogenetic analyses. However, due to the presence of inducible and constitutive HSP70 gene members in many clades (including yeast), it is still difficult to predict the ancestral state.

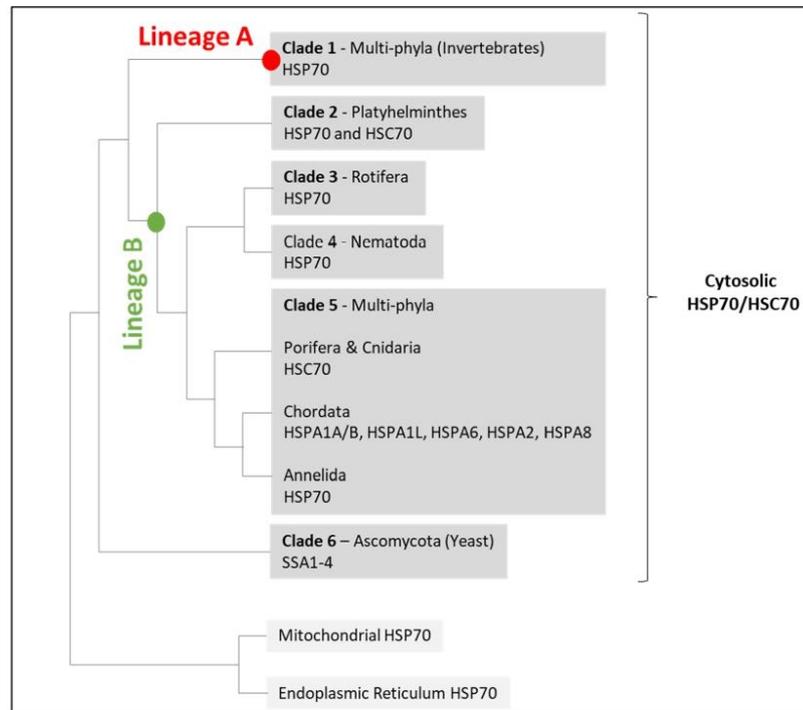


Figure 3. Proposed tree topology of HSP70/HSC70 family members in metazoans (adapted from Yu et al. [32]). Red and green circles show the nodes that give birth to Lineage A of invertebrate HSP70s (clade 1) and Lineage B of both vertebrate and invertebrate HSP70s and all HSC70 genes, respectively. This second lineage has further diversified within diverse phyla: *Platyhelminthes* (clade 2), *Rotifera* (clade 3), *Nematoda* (clade 4), and *Chordata* (clade 5). Clades 1 to 6 include only cytosolic members of the HSP70 family.

Interestingly, an inter-clade comparison of the synonymous and nonsynonymous substitution rates revealed that all HSP70/HSC70 family members are under strong purifying selection [32]. The presence of such a purifying selection was already reported for mammalian [33], nematode [34], molluscan [35], and protist [36] HSP70/HSC70 genes. That positive selection would most likely operate to preserve functions performed by HSP70s, including heat shock response, folding of newly synthesized proteins, protein transport, and autophagy.

Overall, this set of data supports an ancient origin of the chaperone HSC70, and its relatively high sequence conservation between phyla suggests preserved functions during the evolution. This being said, one might be tempted to speculate that the presence of both KFERQ-containing proteins and orthologs of HSC70 in yeast (i.e., *ssa1p*) signs a hallmark of an ancient origin of eMI and/or CMA. However, these two autophagic pathways also rely on other factors, such as members of the ESCRT machinery (in the case of eMI) and LAMP2A (in the case of CMA). Hence, a critical question is whether these factors also appeared very early during evolution or whether eMI/CMA functions formed later on from pre-existing and evolutionary conserved components.

3. Endosomal Microautophagy

After its initial description and characterization in mammals in the late 1980s [37,38], most progress in the microautophagy area has been achieved by research made in yeast, ranging from the microautophagy of peroxisomes [39,40], mitochondria [41], portions of nuclei [42], lipid droplets [43], endoplasmic reticulum [44], certain cytosolic enzymes [15], and vacuole membrane proteins [45]. Altogether, these findings provided evidence that the microautophagy function emerged very early during the evolution and that it can virtually target any cellular structure. However, the diversity of the mechanisms involved in handling/processing these different cellular constituents has led many authors to wonder about the relevance of gathering these distinct types of autophagy under the same “microautophagy” process(es) (or at least terminology) [46].

The present review focused on a specific “subtype” of microautophagy that was first characterized in murine dendritic cells [8]. This process, termed eMI, contributes to in bulk degradation of proteins present in the cytosol and that are embedded in vesicles formed from the LE membrane. However, some cytosolic proteins can also be selectively degraded by eMI after HSC70 recognizes their KFERQ motifs and binds to endosomes via phosphatidylserine [8]. Members of the ESCRT machinery (including at least VPS4 and TSG101) then induce membrane invagination and subsequent internalization of the substrates into intraluminal vesicles [8]. Cargo degradation then occurs either in the LE/MVB compartment or after the fusion of LE/MVB with lysosomes.

More recently, the existence of a similar eMI process was described in the fat body of flies [14]. Akin to mammals, components of the ESCRT machinery have been proven to be necessary for eMI in *Drosophila*. However, in contrast to mammals, eMI in flies involves additional autophagy-related genes (such as *ATG1* and *ATG13*) and is induced after fasting [14]. Of note, genotoxic and oxidative stresses have also been shown to up-regulate eMI in *Drosophila* [47]; although in these cases, the dependence on HSC70 is only partial, pointing out the importance of carefully discriminating between HSC70-dependent and HSC70-independent types of eMI.

Although an HSC70-dependent type of eMI has attracted much attention after it was just discovered, very few data are actually available regarding its regulation and functional implications compared to other forms of autophagy. To our knowledge, this particular mechanism has only been documented in mice [8] and *Drosophila* [14,48]. It is still unclear whether this singular autophagic pathway exists in other living organisms. Interestingly, extensive comparative genomic and phylogenetic studies have demonstrated that ESCRT genes are conserved throughout the eukaryotic lineage [49], as well as in Archaea with respect to some genes [50,51]. That broad distribution in eukaryotes (and some Archaea) supports the early evolutionary origin of the ESCRT machinery and by inference, possibly, of an eMI-like pathway similar to the one described in mice and *Drosophila*. In this context, Liu et al. reported the existence of an ESCRT-dependent eMI-like process relying on the NBR1 protein in fission yeast (*S. pombe*) [15]. However, while this pathway has been proven to be dependent on the ubiquitination of NBR1 and/or its associated proteins, it does not involve HSC70.

4. Chaperone-Mediated Autophagy

CMA activity is tightly correlated with (i) the amount of LAMP2A at the lysosomal membrane [52] and (ii) the assembly/disassembly efficiency of LAMP2A complexes in this compartment [5]. As such, analyzing either the presence/absence of the gene coding for that protein, or the variability observed within the different functional protein domains between phylogenetically distant species, would certainly help decipher the evolutionary history of this function.

4.1. Origin and Evolution of LAMP2

LAMP2A originates from the alternative splicing of the *LAMP2* gene, which also generates two other different splice variants, LAMP2B and LAMP2C. While these three splice variants all share a common luminal domain, they also display different and specific cytosolic and transmembraneTM regions (Figure 4A) [53,54]. In contrast to LAMP2A, neither LAMP2B nor LAMP2C has been shown to be involved in CMA. Instead, LAMP2B is involved in macroautophagy [55,56] and the LAMP2C in the uptake and degradation of DNA and RNA molecules by lysosomes [57,58].

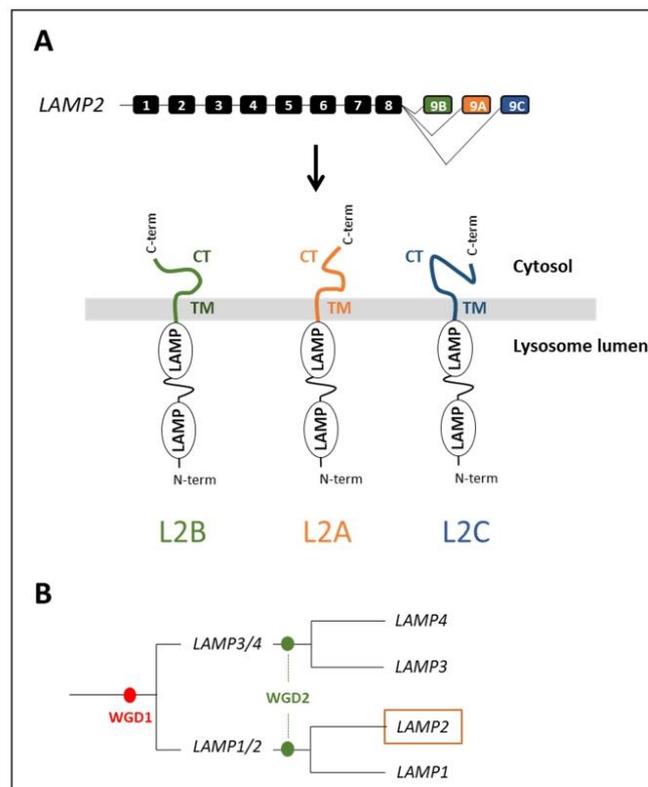


Figure 4. (A) Gene organization of the gene *LAMP2* and protein structure of three splice variants displaying a common luminal domain (with two LAMP domains) but different transmembrane (TM) domain and cytosolic tail (CT). The boxed numbers denote exons. (B) Schematic scenario of the evolutionary history of lamp family genes.

Recently, Lescat et al. provided a comprehensive picture of the evolutionary history of the *LAMP2* gene in vertebrates. They demonstrated that *LAMP2* appeared after the second round of whole-genome duplication (WGD) at the root of the vertebrate lineage, ~500 Ma [13]. More precisely, phylogenetic analyses and synteny conservation data strongly suggest that a single copy of *LAMP* was already present in the common vertebrate ancestor, and that the two successive WGDs that occurred at the root of the vertebrate lineages [59] engendered *LAMP1/2* and *LAMP3/4* (from WGD1), and then *LAMP1*, *LAMP2*, *LAMP3*, and *LAMP4* (from

WGD2) that are common to all vertebrates (Figure 4B). Hence, data support the idea that invertebrates would not factually be able to perform CMA, or at least a LAMP2A-dependent CMA process similar to the one described in mammals [7] and fish [13].

It is also worth noting that, despite the significant genomic rearrangements that some vertebrate lineages have experienced [60], the number of *LAMP2* genes is constant across vertebrate genomes. Indeed, the third WGD, which occurred 320–350 million years ago in the teleost fish ancestor (namely, the teleost-specific round of WGD or TGD), theoretically implies that two orthologs (co-orthologs) of each human *LAMP2* gene would be expected in teleost species, unless lost. Accordingly, both the European eel (*Anguilla anguilla*) and the Asian bonytongue (*Scleropages formosus*), whose lineages diverged shortly after the TGD, display two *LAMP2* genes, with one paralog bearing the three alternative exons and the other only the exons B and C [13] (Figure 5).

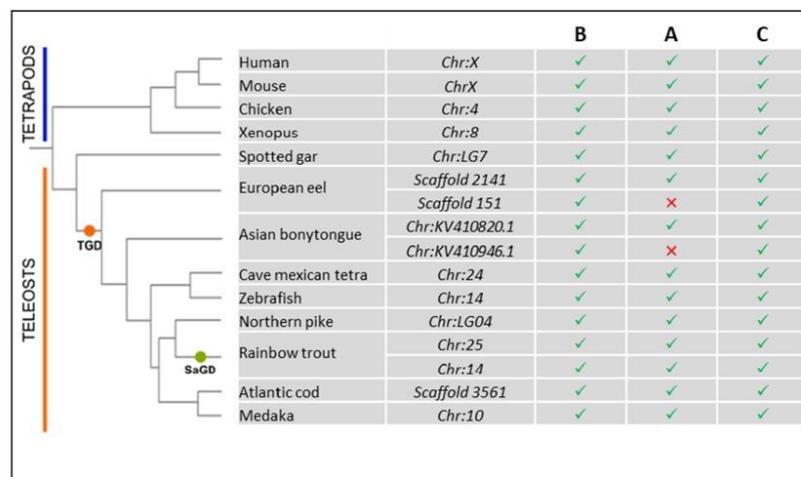


Figure 5. Presence of the three alternative exons (B, A, and C) in the *LAMP2* gene in four tetrapod species—human (*H. sapiens*), mouse (*M. musculus*), chicken (*G. gallus*), and frog (*X. tropicalis*)—and nine fish species—spotted gar (*L. oculatus*), European eel (*A. anguilla*), Asian bonytongue (*S. formosus*), cave Mexican tetra (*A. mexicanus*), zebrafish (*D. rerio*), Northern pike (*E. lucius*), rainbow trout (*O. mykiss*), Atlantic cod (*G. morhua*), and medaka (*O. latipes*). The phylogenetic tree is a representative tree of life. The presence or absence of each alternative exon (B, A, and C) is represented by a green check mark or a red cross mark, respectively. For each species, the location of the gene is specified in the table. TGD, teleost-specific whole-genome duplication; SaGD, salmonid-specific whole-genome duplication.

The absence of exon A in the second *LAMP2* paralog of these two species, belonging to different super-orders, could be due to either independent losses or the specific loss of this exon in the common ancestor of teleost shortly after the TGD. However, this second *LAMP2* gene, which likely results from the TGD, appears to have been lost in all other teleost species investigated [13]. Accordingly, in cave Mexican tetra (*Astyanax mexicanus*), zebrafish (*Danio rerio*), Northern pike (*Esox lucius*), Atlantic cod (*Gadus morhua*), and medaka (*Oryzias latipes*), a unique *LAMP2* is found with all three alternative exons (Figure 5). Interestingly, genome analyses of various salmonid species have revealed the presence of two *LAMP2* genes bearing the three alternative exons A, B, and C, which likely originated from the fourth round of WGD that occurred in the common ancestor of salmonids (SaGD) about 100 million years ago. However, a re-analysis of the PhyloFish RNA-seq database—providing gene expression data from 23 different ray-finned fish species [61]—confirmed the expression of a single *LAMP2A* transcript in all considered salmonids [16]. This suggests that the loss of expression of the second *LAMP2A* transcript is of a common

origin, probably in the ancestor of salmoniforms, shortly after the SaGD. Together, these data suggest that evolution tends to promote the presence of a single LAMP2A protein. Indeed, duplication of the *LAMP2* genes following WGD appears to be systematically followed by the loss of one duplicate, the loss of the A exon, or the lack of expression of one of the two copies (in the case of the recent SaGD). This last point certainly deserves to be clarified in the future.

4.2. Structure Evolution of LAMP2A across Vertebrates

In mammals, the structure of the lysosomal membrane proteins belonging to the LAMP family is now well documented [62–66]. These proteins consist of a large luminal region at the N-terminus, a TM domain of about 20 amino acids, and a short Cytosolic (C-terminal) Tail (CT) stretching from 10–12 amino acids (Figure 4A). In addition, these proteins possess a number of conserved motifs required for protein lysosomal targeting and function (see [5,52,67,68] for details). Although the general architecture of this protein is relatively well conserved among vertebrates, some differences are noticed within the different functional domains of LAMP2A between phylogenetically distant species. Taking advantage of that “evolution in motion” will certainly be of great value for identifying evolutionarily conserved, or species-dependent, key residues necessary for further deciphering the structure–function relationship of this protein.

4.2.1. The GYXX ϕ Motif

According to the literature, the C-terminal ends of LAMP proteins carry a recognition signal for lysosomal targeting, which is characterized by the canonical GYXX ϕ motif (where ϕ is a hydrophobic amino acid) [52]. In mammalian LAMP2A, ϕ is the hydrophobic phenylalanine (F) residue, whose deletion has been shown to impair the proper addressing of LAMP2A to the lysosomal membrane [52]. Further analysis of LAMP2A sequences additionally revealed that this hydrophobic F residue is actually highly conserved in vertebrates (Figure 6). Excepting the absence of that “F” in *Xenopus tropicalis* and *Perca fluviatilis*, the only variations identified are the presence of one or two extra amino acids at the C-terminus in some fish species belonging to ostariophysans (a superorder comprising about 8000 species of bony fish, including catfishes, characins, electric knifefishes, and the zebrafish). In addition, recent findings showing that extra amino acids (i.e., a triple FLAG tag) at the C-terminus of LAMP2A do not impair neither its lysosomal addressing nor its ability to properly target well-known CMA substrates (such as GAPDH) fused to the HaloTag protein (GAPDH-HT) [62] indicate that these extra C-terminus residues are undeniably not crucial for a proper CMA function.

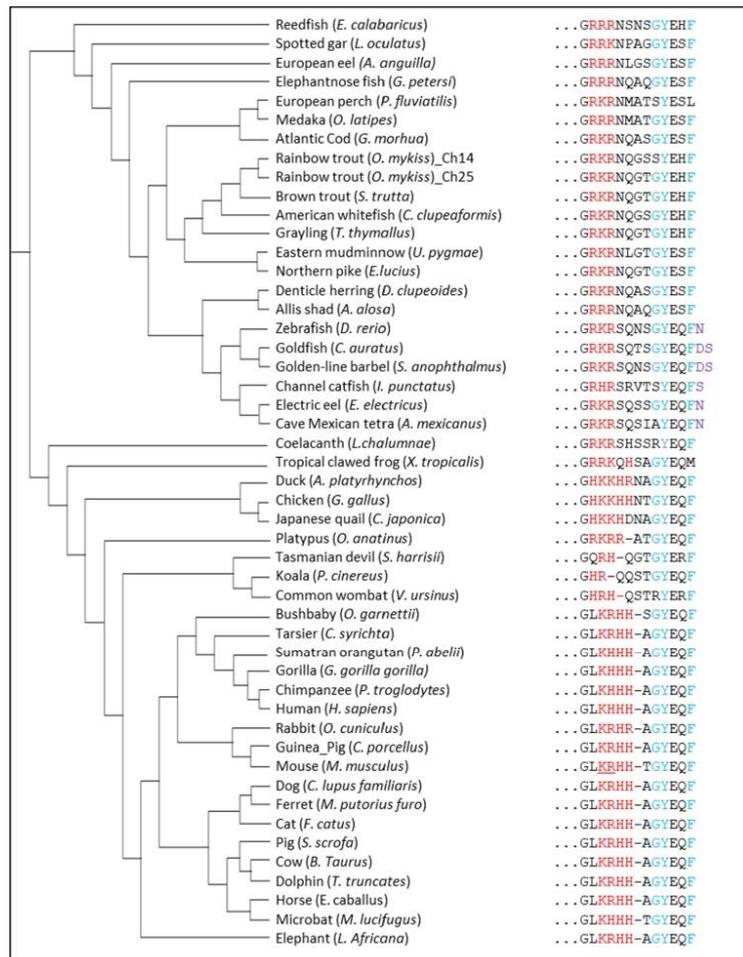


Figure 6. Protein sequence alignment of the short CT tail of LAMP2A from different vertebrates. Positively-charged amino acids required for the binding of substrate proteins are colored in red. The GY dipeptide as well as the hydrophobic F required for the targeting of LAMP2A to lysosomes are in blue. The additional residues at the C-terminus of LAMP2A from fish belonging to ostariophysans are in purple. The K406 and R407 of mouse LAMP2A are underlined.

It should also be noted that, while in the majority of the vertebrate species analyzed the GY dipeptide is conserved when focusing on the cytosolic tail sequence of LAMP2A, it is nevertheless not “retained” in some (e.g., in the common wombat (*Vombatus ursinus*), the blind cave tetra (*Astyanax mexicanus*), the coelacanth (*Latimeria chalumnae*), the channel catfish (*Ictalurus punctatus*), the European perch (*Perca fluviatilis*), and one of the two LAMP2A found in the rainbow trout) (Figure 6). These data might suggest that LAMP2A in these species is (possibly) not correctly targeted to the lysosomal membrane. However, previous studies carried out on the LAMP1 protein (human and mouse), which also presents the GY dipeptide, clearly demonstrated that only tyrosine (Y) is required for the localization of the protein at the lysosomal membrane [67,68]. In contrast, while mutating

the glycine does not impair the correct addressing of LAMP1 to the lysosomal membrane [67], on the other hand, it does affect its routing to the lysosomes [69,70].

Together, these data suggest that the LAMP2A proteins, as far as the large majority of the vertebrates is concerned, do require the presence of the minimal YXXF motif in their cytosolic tails to be correctly addressed to the lysosomal membrane.

4.2.2. Positively-Charged Amino Acids

Although the presence of the YXXF motif identified within the cytosolic tail of the LAMP2A from most vertebrate species suggests that these proteins can, in theory, be properly delivered to the lysosomal membrane, the activity of this protein also relies on several other motifs nested within the C-terminal region. In mammals, it is commonly accepted that the presence of 3–4 positively charged residues within the cytosolic tail of LAMP2A is necessary for the proper recognition and binding of the substrate/chaperone complex [52]. In that direction, isolated lysosomes containing a mutated version of LAMP2A for the four positive residues displayed a lower binding ability against GAPDH when compared to native LAMP2A residues [52].

Very recently, using a site-specific photo-reactive crosslinking experiment, Ikami et al. evidenced the direct interaction of the cytoplasmic tail of mouse LAMP2A together with HSC70 [66]. More precisely, a UV-dependent crosslinking was observed at two positively charged amino acids (K406 and R407 of mouse LAMP2A), which are located immediately after the TM region (underlined residues for the mouse sequence in Figure 6). This finding supports the conclusions drawn after monitoring by nuclear magnetic resonance (NMR)-based chemical shift perturbation (CSP) assay of the interactions between human TM-LAMP2A (369–410, consisting of the transmembrane domain and cytoplasmic tail) and the substrate-binding domain of HSC70 [64]. In the presence of the substrate-binding domain of HSC70, residues K401 and H402 (corresponding to K406 and R407 in mouse LAMP2A, respectively) showed significant CSPs, while those of the TM residues were essentially unchanged [64]. Together, these findings support an intrinsic affinity of HSC70 for the cytoplasmic tail of LAMP2A and an important role of the two positively charged residues in this affinity. Of note, a similar pattern of CSPs was also observed when a CMA substrate, RNase A, was added to TM-LAMP-2A [64], further emphasizing the role of these residues in substrate affinity and specificity.

Interestingly, sequence analysis of vertebrates LAMP2A shows the presence (in the majority of the species considered) of at least three positively charged amino acids (including the two amino acids corresponding to K406 and R407 in mouse LAMP2A) (Figure 6). These results suggest that, in addition to bearing the lysosome membrane addressing motifs discussed above (see Section 4.2.1), the analyzed LAMP2A from most of the vertebrates also carry the motifs necessary for substrate recognition and binding.

4.2.3. Glycine Residues in the Transmembrane Region

The GAALAG motif, located at the TM region of LAMP2A (382–387 in *H. sapiens*), is known to be involved in dimerization. More precisely, it is important for the oligomerization of LAMP2A and, consequently, for the translocation of target proteins inside lysosomes [71]. Site-directed mutagenesis of the two glycine (G) residues to alanine (A) has been shown to impair the oligomerization of LAMP2A and, by implication, substrates translocation [5,64,71]. Recently, an in-depth analysis of the coding sequences of LAMP2A from 45 mammalian species belonging to the nine major placental orders (*Chiroptera*, *Carnivora*, *Perissodactyla*, *Artiodactyla*, *Soricomorpha*, *Erinaceomorpha*, *Primates*, *Lagomorpha*, and *Rodentia*) and three marsupials reported that these two glycines are indeed conserved across mammals [72]. While few exceptions should be noticed in the star-nosed mole (*C. cristata*), for which the second glycine is substituted by an isoleucine, in two megabats, *P. alecto* and *P. vampyrus*, as well as in the *Muridae* family of rodents, *M. musculus*, *M. pahari*, *R. norvegicus*, and *M. caroli*, species for which the motif is converted to GTALAG and GAALGG, respectively, it is not clear whether these variations do significantly affect the dimerization and function of LAMP2A. Nevertheless, the

overall high preservation of the GAALAG motif within the vertebrate clade would support purifying selection during evolution.

Two glycines are also found in the TM region of LAMP2A in three fish species analyzed (spotted garfish, European eel, and arowana). However, one of these two glycines are absent in all other fish considered in our analyses, supporting the existence of functional variation of LAMP2As between species. Nevertheless, effects related to a single glycine mutation have so far not been reported.

4.2.4. The LAMP Domains

In mammals, all LAMP2 proteins (B, A, and C) display two conserved domains—the LAMP domains—being both located in the intra luminal compartment of the lysosomes (Figure 4A). Data reporting on the possible role(s) of these two domains (N- and C-domains) are sparse, but a recent study suggests that the N-domain may act as a negative regulator of the (self)multimerization step between LAMP2 proteins [65]. Interestingly, sequence analysis of the different LAMP2As retrieved from the above-mentioned [72] placental mammals clearly indicates that the N-domain is less conserved compared to the second luminal C-domain. The same holds when compared to the TM and CT regions. These results suggest that a relaxation of the purifying selection may have occurred for this distal luminal domain, allowing it to harbor functional diversity during mammalian evolution. In this regard, it is noteworthy that, in fish species belonging to the Ostariophyses (including zebrafish), this luminal N-domain displays major structural variations (Figure 7), further supporting the possibility that it may play an important role accounting for the functional variation of LAMP2A between vertebrates. However, further functional analyses will be required to support this hypothesis.

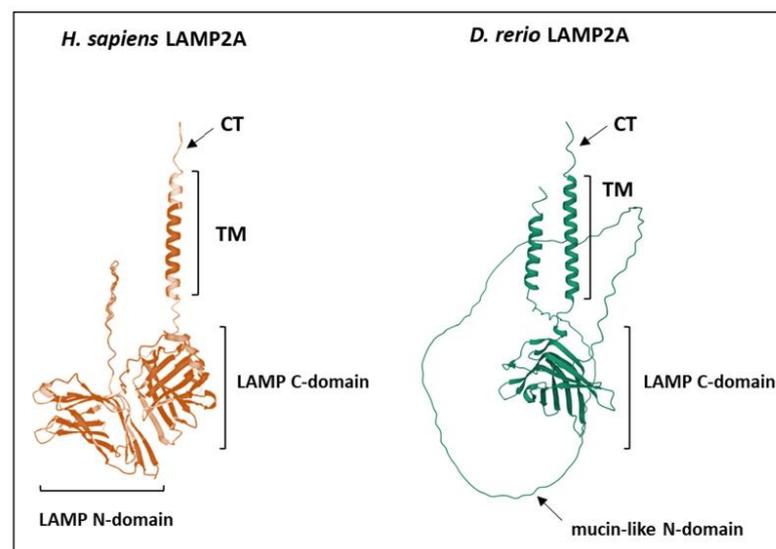


Figure 7. Structure prediction of *Homo sapiens* and *Danio rerio* LAMP2As showing the strong structural divergence of the two proteins at the membrane-distal LAMP domain (Source: AlphaFold Protein Structure Database [73,74]). Instead of a beta-sheet structure classically observed in most vertebrates, the zebrafish N-domain exhibits a mucin-like structure. CT, cytoplasmic tail; TM, transmembrane domain; LAMP C-domain, membrane-proximal LAMP domain; LAMP N-domain, membrane-distal LAMP domain.

Overall, these data show that the sequences of LAMP2As from different vertebrates contain the motifs necessary for (i) addressing the lysosomal membrane, (ii) recognizing the substrates to be degraded, and (iii) acquiring the conformation necessary for translocation across the lysosomal membrane. It thus suggests that most vertebrates may have a CMA (or CMA-like) activity similar to that described in humans and mice (and recently in fish). However, depending on the species considered, these motifs nevertheless harbor numerous variations compared to the “canonical” human or mice LAMP2As. Which residues are dispensable, required, or absolutely crucial for the proper functioning of LAMP2A remain to be functionally tested.

5. Concluding Remarks and Pending Questions

In mammals, the coexistence of CMA and eMI, both of which rely on the recognition of a KFERQ-like motif by the chaperone HSC70, raises many questions dealing with the respective roles of these two pathways and their interplay [9]. However, this dichotomic picture does not seem to apply to all species, and the presence of only one of both functions, or even none of them, has already been reported in some organisms [22]. Such a diversity of situations offers the opportunity to better appreciate the respective role(s) of each of these functions independently and from a comparative/evolutionary point of view. However, it also raises fundamental questions about the evolutionary history of these two functions: when did they appear?; how did they evolve?; how did they conjointly evolve?; can they functionally substitute each other?

Overall, the data we aggregated in the present review provide unequivocal evidence that the *LAMP2* gene appeared at the onset of vertebrate radiation [13], de facto indicating that CMA (as currently described) is specific to this lineage. However, the existing sequence variability within the different functional domains of LAMP2A between phylogenetically distant vertebrates may suggest that CMA function has evolved differently between species, ultimately resulting in a variety of different cellular/physiological functions. In the future, the study of the structure/function relationship of LAMP2A in diverse vertebrates will certainly help decipher the functional importance of the several different domains of this protein and, more generally, will provide new insights into the species-specificities of this function in non-mammalian species.

The origin and the evolutionary trajectory of eMI are not that straightforward. Indeed, although most of the core proteins/components of eMI (including the chaperone HSC70, KFERQ-motif containing proteins, as well as major components of the ESCRT machinery) are already present at the onset of eukaryotic evolution, functional validations of this function (as currently defined) have only been provided for mice and *Drosophila* [8,14]. On the other hand, the existence of an ESCRT-dependent eMI-like process has been reported in fission yeast (*S. pombe*), arguing for a much more ancient origin of this process [15]. However, and unlike the eMI process described in mammals and *Drosophila*, the yeast pathway does not rely on HSC70, suggesting that these should be considered as two distinct mechanisms. Hence, the question of the origin and evolution of the eMI still remains open and will certainly provide new exciting avenues for autophagy research in the next coming years.

Author Contributions: Conceptualization, I.S. and A.H.; writing—original draft preparation, S.S., M.G., and E.J.V.; writing—review and editing, F.B., A.D., I.S., and A.H.; visualization, S.S., M.G., and E.J.V.; supervision, I.S. and A.H.; project administration, I.S.; funding acquisition, I.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by (i) I-site E2S: Energy and Environmental Solutions from the University of Pau and Pays de l’Adour (S.S., PhD fellowship: UPPA contract 2020-11); (ii) La Communauté d’Agglomération Pays Basque (M.G., PhD fellowship: INRAE contract 00004643); (iii) FONDS EUROPEEN POUR LES AFFAIRES MARITIMES ET LA PECHE (VITASWEET project n°PFEA470019FA1000005). This work was additionally supported by the TUNESAL (Research Project- HAVBRUK2, PN: 294971) and AquaExcel3.0 (Grant Agreement No. 871108) projects to AH, AD and IS.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Chiang, H.L.; Dice, J.F. Peptide Sequences That Target Proteins for Enhanced Degradation during Serum Withdrawal. *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 6797–6805. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)68713-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)68713-7).
- Chiang, H.L.; Terlecky, S.R.; Plant, C.P.; Dice, J.F. A Role for a 70-Kilodalton Heat Shock Protein in Lysosomal Degradation of Intracellular Proteins. *Science* **1989**, *246*, 382–385. <https://doi.org/10.1126/science.2799391>.
- Agarraberes, F.A.; Dice, J.F. A Molecular Chaperone Complex at the Lysosomal Membrane Is Required for Protein Translocation. *J. Cell Sci.* **2001**, *114*, 2491–2499. <https://doi.org/10.1242/jcs.114.13.2491>.
- Cuervo, A.M.; Dice, J.F. A Receptor for the Selective Uptake and Degradation of Proteins by Lysosomes. *Science* **1996**, *273*, 501–503. <https://doi.org/10.1126/science.273.5274.501>.
- Bandyopadhyay, U.; Kaushik, S.; Varticovski, L.; Cuervo, A.M. The Chaperone-Mediated Autophagy Receptor Organizes in Dynamic Protein Complexes at the Lysosomal Membrane. *Mol. Cell. Biol.* **2008**, *28*, 5747–5763. <https://doi.org/10.1128/MCB.02070-07>.
- Bandyopadhyay, U.; Sridhar, S.; Kaushik, S.; Kiffin, R.; Cuervo, A.M. Identification of Regulators of Chaperone-Mediated Autophagy. *Mol. Cell* **2010**, *39*, 535–547. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.08.004>.
- Kaushik, S.; Cuervo, A.M. The Coming of Age of Chaperone-Mediated Autophagy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2018**, *19*, 365–381. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0001-6>.
- Sahu, R.; Kaushik, S.; Clement, C.C.; Cannizzo, E.S.; Scharf, B.; Follenzi, A.; Potolicchio, I.; Nieves, E.; Cuervo, A.M.; Santambrogio, L. Microautophagy of Cytosolic Proteins by Late Endosomes. *Dev. Cell* **2011**, *20*, 131–139. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.12.003>.
- Tekirdag, K.; Cuervo, A.M. Chaperone-Mediated Autophagy and Endosomal Microautophagy: Joint by a Chaperone. *J. Biol. Chem.* **2018**, *293*, 5414–5424. <https://doi.org/10.1074/jbc.R117.818237>.
- Morozova, K.; Clement, C.C.; Kaushik, S.; Stiller, B.; Arias, E.; Ahmad, A.; Rauch, J.N.; Chatterjee, V.; Melis, C.; Scharf, B.; et al. Structural and Biological Interaction of Hsc70 Protein with Phosphatidylserine in Endosomal Microautophagy. *J. Biol. Chem.* **2016**, *291*, 18096–18106. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.736744>.
- Caballero, B.; Wang, Y.; Diaz, A.; Tasset, L.; Juste, Y.R.; Stiller, B.; Mandelkow, E.-M.; Mandelkow, E.; Cuervo, A.M. Interplay of Pathogenic Forms of Human Tau with Different Autophagic Pathways. *Aging Cell* **2018**, *17*, e12692. <https://doi.org/10.1111/acel.12692>.
- Caballero, B.; Bourdenx, M.; Luengo, E.; Diaz, A.; Sohn, P.D.; Chen, X.; Wang, C.; Juste, Y.R.; Wegmann, S.; Patel, B.; et al. Acetylated Tau Inhibits Chaperone-Mediated Autophagy and Promotes Tau Pathology Propagation in Mice. *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 2238. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22501-9>.
- Lescat, L.; Véron, V.; Mourot, B.; Péron, S.; Chenais, N.; Dias, K.; Riera-Heredia, N.; Beaumatin, F.; Pinel, K.; Priault, M.; et al. Chaperone-Mediated Autophagy in the Light of Evolution: Insight from Fish. *Mol. Biol. Evol.* **2020**, *37*, 2887–2899. <https://doi.org/10.1093/molbev/msaa127>.
- Mukherjee, A.; Patel, B.; Koga, H.; Cuervo, A.M.; Jenny, A. Selective Endosomal Microautophagy Is Starvation-Inducible in *Drosophila*. *Autophagy* **2016**, *12*, 1984–1999. <https://doi.org/10.1080/15548627.2016.1208887>.
- Liu, X.-M.; Sun, L.-L.; Hu, W.; Ding, Y.-H.; Dong, M.-Q.; Du, L.-L. ESCRTs Cooperate with a Selective Autophagy Receptor to Mediate Vacuolar Targeting of Soluble Cargos. *Mol. Cell* **2015**, *59*, 1035–1042. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.07.034>.
- Lescat, L.; Herpin, A.; Mourot, B.; Véron, V.; Guiguen, Y.; Bobe, J.; Seiliez, I. CMA Restricted to Mammals and Birds: Myth or Reality? *Autophagy* **2018**, *14*, 1267–1270. <https://doi.org/10.1080/15548627.2018.1460021>.
- Dice, J.F. Peptide Sequences That Target Cytosolic Proteins for Lysosomal Proteolysis. *Trends Biochem. Sci.* **1990**, *15*, 305–309. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(90\)90019-8](https://doi.org/10.1016/0968-0004(90)90019-8).
- Lv, L.; Li, D.; Zhao, D.; Lin, R.; Chu, Y.; Zhang, H.; Zha, Z.; Liu, Y.; Li, Z.; Xu, Y.; et al. Acetylation Targets the M2 Isoform of Pyruvate Kinase for Degradation through Chaperone-Mediated Autophagy and Promotes Tumor Growth. *Mol. Cell* **2011**, *42*, 719–730. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.04.025>.
- Kaushik, S.; Cuervo, A.M. Degradation of Lipid Droplet-Associated Proteins by Chaperone-Mediated Autophagy Facilitates Lipolysis. *Nat. Cell Biol.* **2015**, *17*, 759–770. <https://doi.org/10.1038/ncb3166>.
- Bonhoure, A.; Vallentin, A.; Martin, M.; Senif-Ribeiro, A.; Amson, R.; Telerman, A.; Vidal, M. Acetylation of Translationally Controlled Tumor Protein Promotes Its Degradation through Chaperone-Mediated Autophagy. *Eur. J. Cell Biol.* **2017**, *96*, 83–98. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2016.12.002>.
- Jackson, M.P.; Hewitt, E.W. Cellular Proteostasis: Degradation of Misfolded Proteins by Lysosomes. *Essays Biochem.* **2016**, *60*, 173–180. <https://doi.org/10.1042/EBC20160005>.

22. Kirchner, P.; Bourdenx, M.; Madrigal-Matute, J.; Tiano, S.; Diaz, A.; Bartholdy, B.A.; Will, B.; Cuervo, A.M. Proteome-Wide Analysis of Chaperone-Mediated Autophagy Targeting Motifs. *PLoS Biol.* **2019**, *17*, e3000301. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000301>.
23. Stricher, F.; Macri, C.; Ruff, M.; Muller, S. HSPA8/HSC70 Chaperone Protein: Structure, Function, and Chemical Targeting. *Autophagy* **2013**, *9*, 1937–1954. <https://doi.org/10.4161/auto.26448>.
24. Liao, Y.; Tang, L. The Critical Roles of HSC70 in Physiological and Pathological Processes. *Curr. Pharm. Des.* **2014**, *20*, 101–107. <https://doi.org/10.2174/13816128113199990585>.
25. Bonam, S.R.; Ruff, M.; Muller, S. HSPA8/HSC70 in Immune Disorders: A Molecular Rheostat That Adjusts Chaperone-Mediated Autophagy Substrates. *Cells* **2019**, *8*, E849. <https://doi.org/10.3390/cells8080849>.
26. Gupta, R.S.; Singh, B. Phylogenetic Analysis of 70 KD Heat Shock Protein Sequences Suggests a Chimeric Origin for the Eukaryotic Cell Nucleus. *Curr. Biol.* **1994**, *4*, 1104–1114. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(00\)00249-9](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(00)00249-9).
27. Hunt, C.; Morimoto, R.I. Conserved Features of Eukaryotic Hsp70 Genes Revealed by Comparison with the Nucleotide Sequence of Human Hsp70. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, *82*, 6455–6459. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.19.6455>.
28. Lindquist, S.; Craig, E.A. The Heat-Shock Proteins. *Annu. Rev. Genet.* **1988**, *22*, 631–677. <https://doi.org/10.1146/annurev.ge.22.120188.003215>.
29. Pan, Z.; Zhang, Z.; Zhuo, L.; Wan, T.; Li, Y. Bioinformatic and Functional Characterization of Hsp70s in *Myxococcus Xanthus*. *mSphere* **2021**, *6*, e00305-21. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00305-21>.
30. Werner-Washburne, M.; Craig, E.A. Expression of Members of the *Saccharomyces Cerevisiae* Hsp70 Multigene Family. *Genome* **1989**, *31*, 684–689. <https://doi.org/10.1139/g89-125>.
31. Boorstein, W.R.; Ziegelhoffer, T.; Craig, E.A. Molecular Evolution of the HSP70 Multigene Family. *J. Mol. Evol.* **1994**, *38*, 1–17. <https://doi.org/10.1007/BF00175490>.
32. Yu, E.; Yoshinaga, T.; Jalufka, F.L.; Ehsan, H.; Welch, D.B.M.; Kaneko, G. The Complex Evolution of the Metazoan HSP70 Gene Family. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 17794. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-97192-9>.
33. Hess, K.; Oliverio, R.; Nguyen, P.; Le, D.; Ellis, J.; Kdeiss, B.; Ord, S.; Chalkia, D.; Nikolaidis, N. Concurrent Action of Purifying Selection and Gene Conversion Results in Extreme Conservation of the Major Stress-Inducible Hsp70 Genes in Mammals. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 5082. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23508-x>.
34. Nikolaidis, N.; Nei, M. Concerted and Nonconcerted Evolution of the Hsp70 Gene Superfamily in Two Sibling Species of Nematodes. *Mol. Biol. Evol.* **2004**, *21*, 498–505. <https://doi.org/10.1093/molbev/msh041>.
35. Kourtidis, A.; Drosopoulou, E.; Nikolaidis, N.; Hatz, V.I.; Chintiroglou, C.C.; Scouras, Z.G. Identification of Several Cytoplasmic HSP70 Genes from the Mediterranean Mussel (*Mytilus Galloprovincialis*) and Their Long-Term Evolution in Mollusca and Metazoa. *J. Mol. Evol.* **2006**, *62*, 446–459. <https://doi.org/10.1007/s00239-005-0121-4>.
36. Krenek, S.; Schlegel, M.; Berendonk, T.U. Convergent Evolution of Heat-Inducibility during Subfunctionalization of the Hsp70 Gene Family. *BMC Evol. Biol.* **2013**, *13*, 49. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-13-49>.
37. Marzella, L.; Ahlberg, J.; Glaumann, H. Autophagy, Heterophagy, Microautophagy and Crinophagy as the Means for Intracellular Degradation. *Virchows Arch. B Cell Pathol. Incl. Mol. Pathol.* **1981**, *36*, 219–234. <https://doi.org/10.1007/bf02912068>.
38. Mortimore, G.E.; Lardeux, B.R.; Adams, C.E. Regulation of Microautophagy and Basal Protein Turnover in Rat Liver. Effects of Short-Term Starvation. *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 2506–2512. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)69235-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)69235-X).
39. Tuttle, D.L.; Lewin, A.S.; Dunn, W.A. Selective Autophagy of Peroxisomes in Methylotrophic Yeasts. *Eur. J. Cell Biol.* **1993**, *60*, 283–290.
40. Sakai, Y.; Koller, A.; Rangel, L.K.; Keller, G.A.; Subramani, S. Peroxisome Degradation by Microautophagy in *Pichia Pastoris*: Identification of Specific Steps and Morphological Intermediates. *J. Cell Biol.* **1998**, *141*, 625–636. <https://doi.org/10.1083/jcb.141.3.625>.
41. Campbell, C.L.; Thorsness, P.E. Escape of Mitochondrial DNA to the Nucleus in *Yme1* Yeast Is Mediated by Vacuolar-Dependent Turnover of Abnormal Mitochondrial Compartments. *J. Cell Sci.* **1998**, *111*, 2455–2464. <https://doi.org/10.1242/jcs.111.16.2455>.
42. Roberts, P.; Moshitch-Moshkovitz, S.; Kvam, E.; O'Toole, E.; Winey, M.; Goldfarb, D.S. Piecemeal Microautophagy of Nucleus in *Saccharomyces Cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* **2003**, *14*, 129–141. <https://doi.org/10.1091/mbc.e02-08-0483>.
43. Van Zutphen, T.; Todde, V.; de Boer, R.; Kreim, M.; Hofbauer, H.F.; Wolinski, H.; Veenhuis, M.; van der Klei, I.J.; Kohlwein, S.D. Lipid Droplet Autophagy in the Yeast *Saccharomyces Cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* **2014**, *25*, 290–301. <https://doi.org/10.1091/mbc.e13-08-0448>.
44. Schuck, S.; Gallagher, C.M.; Walter, P. ER-Phagy Mediates Selective Degradation of Endoplasmic Reticulum Independently of the Core Autophagy Machinery. *J. Cell Sci.* **2014**, *127*, 4078–4088. <https://doi.org/10.1242/jcs.154716>.
45. Yang, X.; Zhang, W.; Wen, X.; Bulinski, P.J.; Chomchai, D.A.; Arines, F.M.; Liu, Y.-Y.; Sprenger, S.; Teis, D.; Klionsky, D.J.; et al. TORC1 Regulates Vacuole Membrane Composition through Ubiquitin- and ESCRT-Dependent Microautophagy. *J. Cell Biol.* **2020**, *219*, e201902127. <https://doi.org/10.1083/jcb.201902127>.
46. Schuck, S. Microautophagy—Distinct Molecular Mechanisms Handle Cargoes of Many Sizes. *J. Cell Sci.* **2020**, *133*, jcs246322. <https://doi.org/10.1242/jcs.246322>.
47. Mesquita, A.; Glenn, J.; Jenny, A. Differential Activation of EMI by Distinct Forms of Cellular Stress. *Autophagy* **2021**, *17*, 1828–1840. <https://doi.org/10.1080/15548627.2020.1783833>.

48. Uytterhoeven, V.; Lauwers, E.; Maes, I.; Miskiewicz, K.; Melo, M.N.; Swerts, J.; Kuenen, S.; Wittcox, R.; Corthout, N.; Marrink, S.-J.; et al. Hsc70-4 Deforms Membranes to Promote Synaptic Protein Turnover by Endosomal Microautophagy. *Neuron* **2015**, *88*, 735–748. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.10.012>.
49. Leung, K.F.; Dacks, J.B.; Field, M.C. Evolution of the Multivesicular Body ESCRT Machinery; Retention Across the Eukaryotic Lineage. *Traffic* **2008**, *9*, 1698–1716. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2008.00797.x>.
50. Spang, A.; Saw, J.H.; Jørgensen, S.L.; Zaremba-Niedzwiedzka, K.; Martijn, J.; Lind, A.E.; van Eijk, R.; Schleper, C.; Guy, L.; Ettema, T.J.G. Complex Archaea That Bridge the Gap between Prokaryotes and Eukaryotes. *Nature* **2015**, *521*, 173–179. <https://doi.org/10.1038/nature14447>.
51. Hatano, T.; Palani, S.; Papatziomou, D.; Salzer, R.; Souza, D.P.; Tamarit, D.; Makwana, M.; Potter, A.; Haig, A.; Xu, W.; et al. Asgard Archaea Shed Light on the Evolutionary Origins of the Eukaryotic Ubiquitin-ESCRT Machinery. *Nat. Commun.* **2022**, *13*, 3398. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-30656-2>.
52. Cuervo, A.M.; Dice, J.F. Unique Properties of Lamp2a Compared to Other Lamp2 Isoforms. *J. Cell Sci.* **2000**, *113*, 4441–4450.
53. Gough, N.R.; Hatem, C.L.; Fambrough, D.M. The Family of LAMP-2 Proteins Arises by Alternative Splicing from a Single Gene: Characterization of the Avian LAMP-2 Gene and Identification of Mammalian Homologs of LAMP-2b and LAMP-2c. *DNA Cell Biol.* **1995**, *14*, 863–867. <https://doi.org/10.1089/dna.1995.14.863>.
54. Hatem, C.L.; Gough, N.R.; Fambrough, D.M. Multiple MRNAs Encode the Avian Lysosomal Membrane Protein LAMP-2, Resulting in Alternative Transmembrane and Cytoplasmic Domains. *J. Cell Sci.* **1995**, *108*, 2093–2100. <https://doi.org/10.1242/jcs.108.5.2093>.
55. Nishino, I.; Fu, J.; Tanji, K.; Yamada, T.; Shimojo, S.; Koori, T.; Mora, M.; Riggs, J.E.; Oh, S.J.; Koga, Y.; et al. Primary LAMP-2 Deficiency Causes X-Linked Vacuolar Cardiomyopathy and Myopathy (Danon Disease). *Nature* **2000**, *406*, 906–910. <https://doi.org/10.1038/35022604>.
56. Chi, C.; Leonard, A.; Knight, W.E.; Beussman, K.M.; Zhao, Y.; Cao, Y.; Londono, P.; Aune, E.; Trembley, M.A.; Small, E.M.; et al. LAMP-2B Regulates Human Cardiomyocyte Function by Mediating Autophagosome–Lysosome Fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2019**, *116*, 556–565. <https://doi.org/10.1073/pnas.1808618116>.
57. Fujiwara, Y.; Furuta, A.; Kikuchi, H.; Aizawa, S.; Hatanaka, Y.; Konya, C.; Uchida, K.; Yoshimura, A.; Tamai, Y.; Wada, K.; et al. Discovery of a Novel Type of Autophagy Targeting RNA. *Autophagy* **2013**, *9*, 403–409. <https://doi.org/10.4161/auto.23002>.
58. Fujiwara, Y.; Kikuchi, H.; Aizawa, S.; Furuta, A.; Hatanaka, Y.; Konya, C.; Uchida, K.; Wada, K.; Kabuta, T. Direct Uptake and Degradation of DNA by Lysosomes. *Autophagy* **2013**, *9*, 1167–1171. <https://doi.org/10.4161/auto.24880>.
59. Dehal, P.; Boore, J.L. Two Rounds of Whole Genome Duplication in the Ancestral Vertebrate. *PLoS Biol.* **2005**, *3*, e314. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030314>.
60. Ravi, V.; Venkatesh, B. The Divergent Genomes of Teleosts. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* **2018**, *6*, 47–68. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-030117-014821>.
61. Pasquier, J.; Cabau, C.; Nguyen, T.; Jouanno, E.; Severac, D.; Braasch, I.; Journot, L.; Pontarotti, P.; Klopp, C.; Postlethwait, J.H.; et al. Gene Evolution and Gene Expression after Whole Genome Duplication in Fish: The PhyloFish Database. *BMC Genom.* **2016**, *17*, 368. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2709-z>.
62. Terasawa, K.; Kato, Y.; Ikami, Y.; Sakamoto, K.; Ohtake, K.; Kusano, S.; Tomabechi, Y.; Kukimoto-Niino, M.; Shirouzu, M.; Guan, J.-L.; et al. Direct Homophilic Interaction of LAMP2A with the Two-Domain Architecture Revealed by Site-Directed Photo-Crosslinks and Steric Hindrances in Mammalian Cells. *Autophagy* **2021**, *17*, 4286–4304. <https://doi.org/10.1080/15548627.2021.1911017>.
63. Wilke, S.; Krausze, J.; Büssow, K. Crystal Structure of the Conserved Domain of the DC Lysosomal Associated Membrane Protein: Implications for the Lysosomal Glycocalyx. *BMC Biol.* **2012**, *10*, 62. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-10-62>.
64. Rout, A.K.; Strub, M.-P.; Piszczek, G.; Tjandra, N. Structure of Transmembrane Domain of Lysosome-Associated Membrane Protein Type 2a (LAMP-2A) Reveals Key Features for Substrate Specificity in Chaperone-Mediated Autophagy. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 35111–35123. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.609446>.
65. Terasawa, K.; Tomabechi, Y.; Ikeda, M.; Ehara, H.; Kukimoto-Niino, M.; Wakiyama, M.; Podyma-Inoue, K.A.; Rajapakshe, A.R.; Watabe, T.; Shirouzu, M.; et al. Lysosome-Associated Membrane Proteins-1 and -2 (LAMP-1 and LAMP-2) Assemble via Distinct Modes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2016**, *479*, 489–495. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.09.093>.
66. Ikami, Y.; Terasawa, K.; Sakamoto, K.; Ohtake, K.; Harada, H.; Watabe, T.; Yokoyama, S.; Hara-Yokoyama, M. The Two-Domain Architecture of LAMP2A Regulates Its Interaction with Hsc70. *Exp. Cell Res.* **2022**, *411*, 112986. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2021.112986>.
67. Williams, M.A.; Fukuda, M. Accumulation of Membrane Glycoproteins in Lysosomes Requires a Tyrosine Residue at a Particular Position in the Cytoplasmic Tail. *J. Cell Biol.* **1990**, *111*, 955–966. <https://doi.org/10.1083/jcb.111.3.955>.
68. Guarnieri, F.G.; Arterburn, L.M.; Penno, M.B.; Cha, Y.; August, J.T. The Motif Tyr-X-X-Hydrophobic Residue Mediates Lysosomal Membrane Targeting of Lysosome-Associated Membrane Protein 1. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 1941–1946.
69. Hunziker, W.; Harter, C.; Matter, K.; Mellman, I. Basolateral Sorting in MDCK Cells Requires a Distinct Cytoplasmic Domain Determinant. *Cell* **1991**, *66*, 907–920. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90437-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90437-4).
70. Harter, C.; Mellman, I. Transport of the Lysosomal Membrane Glycoprotein Lgp120 (Lgp-A) to Lysosomes Does Not Require Appearance on the Plasma Membrane. *J. Cell Biol.* **1992**, *117*, 311–325. <https://doi.org/10.1083/jcb.117.2.311>.
71. Russ, W.P.; Engelman, D.M. The GxxxG Motif: A Framework for Transmembrane Helix-Helix Association. *J. Mol. Biol.* **2000**, *296*, 911–919. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.3489>.

72. Jalali, Z.; Parvaz, N. Molecular Evolution of Autophagy Rate-Limiting Factor LAMP2 in Placental Mammals. *Gene* **2020**, *727*, 144231. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2019.144231>.
73. Jumper, J.; Evans, R.; Pritzel, A.; Green, T.; Figurnov, M.; Ronneberger, O.; Tunyasuvunakool, K.; Bates, R.; Židek, A.; Potapenko, A.; et al. Highly Accurate Protein Structure Prediction with AlphaFold. *Nature* **2021**, *596*, 583–589. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>.
74. Varadi, M.; Anyango, S.; Deshpande, M.; Nair, S.; Natassia, C.; Yordanova, G.; Yuan, D.; Stroe, O.; Wood, G.; Laydon, A.; et al. AlphaFold Protein Structure Database: Massively Expanding the Structural Coverage of Protein-Sequence Space with High-Accuracy Models. *Nucleic Acids Res.* **2022**, *50*, D439–D444. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1061>.

Publication 2:

Chaperone-mediated autophagy regulates spermatogenesis: new insights from zebrafish

Objectifs :

Cet article avait pour objectifs (i) de démontrer l'existence d'une activité CMA chez le poisson zèbre, (ii) de générer chez cette espèce une lignée transgénique exprimant de manière ubiquitaire et constitutive un rapporteur fluorescent de l'activité CMA et (iv) de démontrer l'utilité de cette lignée pour améliorer nos connaissances sur la régulation et le rôle de la CMA.

Principaux résultats :

- En adaptant une méthode mise en place chez les mammifères pour mesurer l'activité de la CMA dans des cellules primaires embryonnaires de poisson zèbre, nous avons confirmé la présence de cette fonction chez cette espèce.
- L'établissement d'une lignée de poisson zèbre transgénique exprimant un rapporteur fluorescent de CMA nous a permis de mettre en évidence une forte régionalisation de l'activité de la CMA au niveau des gonades. Dans les testicules, la CMA semble n'être activée que dans les cellules de Sertoli, un type cellulaire jouant un rôle nourricier, de soutien et de maturation des cellules germinales.
- L'inactivation de Lamp2A chez le poisson zèbre induit des perturbations dans le processus de spermatogenèse et dans la physiologie des spermatozoïdes. Ces derniers présentaient une forte baisse de leur motilité comparée aux spermatozoïdes issus de poissons contrôles.
- Des analyses protéomiques des spermatozoïdes chez nos poissons LAMP2A-KO ont pu mettre en évidence une surexpression de nombreuses protéines impliquées dans la chaîne respiratoire mitochondriale.
- Des analyses complémentaires ont montré une baisse significative du potentiel membranaire des mitochondries issues des spermatozoïdes LAMP2A-KO.

Conclusion :

L'ensemble des résultats obtenu dans cette étude démontre la pertinence du poisson zèbre comme modèle d'étude de la CMA et dévoile un rôle, jusque-là inconnu, de cette fonction dans la spermatogenèse.

Chaperone-mediated autophagy regulates spermatogenesis: new insights from zebrafish

Maxime Goguet^{1,2}, Emilio J Véléz¹, Simon Schnebert¹, Karine Dias¹, Vincent Véron¹, Alexandra Depincé², Florian Beaumatin¹, Amaury Herpin^{2, †}, Iban Seiliez^{1, †, *}

¹Université de Pau et des Pays de l'Adour, E2S UPPA, INRAE, UMR1419 Nutrition Métabolisme et Aquaculture, F-64310 Saint-Pée-sur-Nivelle, France.

²INRAE, UR1037 Laboratory of Fish Physiology and Genomics, Campus de Beaulieu, Rennes, F-35042, France.

*Corresponding author:

Iban Seiliez

UMR1419 NuMeA, INRAE/UPPA

F64310 Saint Pée sur Nivelle, France.

Tel: (33) 5 59 51 59 99; Fax: (33) 5 59 54 51 52

e-mail: iban.seiliez@inrae.fr

[†] These authors contributed equally to this work

Keywords: Autophagy, CMA, chaperone-mediated autophagy, Lamp2a, fish, zebrafish, evolution

ABSTRACT

Chaperone-Mediated-Autophagy (CMA) is a major pathway of lysosomal proteolysis. As such, it has been recognized as a key player for controlling numerous cellular functions, and failure of that catabolic pathway has been associated with several pathologies. While CMA has been for a long time solely described and characterized in mammals and birds, it was only recently evidenced in fish, reshuffling the cards regarding how the entire CMA function evolved across metazoans. Given the exciting perspectives this finding offers, we now propose to investigate the CMA function in a powerful genetic model: namely the zebrafish (*Danio rerio*). After we first adapted and validated a fluorescent reporter (KFERQ-Dendra2) previously used to track CMA in mammalian cells in zebrafish primary embryonic cells, we now show that this CMA reporter localizes, upon long-term starvation, to lysosomes and/or late endosomes in a KFERQ- and Lamp2a-dependent manner. These results hence provide unequivocal evidences for the existence of a functional CMA process in this fish species as well. To go further, we developed a KFERQ-Dendra2 transgenic reporter zebrafish that allows determining and tracking the spatiotemporal dynamic changes of CMA activity *in vivo*. We revealed an unforeseen heterogeneity of CMA response within the testes, validating the relevance of this model to study cell- and tissue-specific changes in CMA activity, and revealed an unexpected role for this function in gametogenesis. Collectively, these results confirm that zebrafish is definitively a must-have model for improving our understanding of the fundamental mechanisms involved in CMA, including testing/validating *in vivo* novel therapeutic compounds targeting this fundamental function.

INTRODUCTION

Chaperone-Mediated-Autophagy (CMA) is a major pathway of lysosomal proteolysis essential for the control of cellular homeostasis and metabolism¹. Due to its ability to target damaged or non-functional proteins for degradation, CMA has been shown to be critical for intracellular protein quality control². Another core feature of CMA is the wide diversity of proteins it selectively targets, which link this function to the control of numerous intracellular processes, including (but not limited to) glucose and lipid metabolism³, cell cycle⁴, transcriptional programs⁵, immune response⁶ and pluripotency of stem cells.⁷ Not surprisingly, CMA dysfunctions have been associated to the occurrence of several human pathologies, including neurodegenerative diseases, cancers and immune disorders⁸, and a major research effort is currently underway to clarify the underlying mechanisms.

In details, during CMA, cytosolic proteins containing a pentapeptide sequence sharing biochemical similarity to KFERQ (lysine-phenylalanine-glutamate-arginine-glutamine) are first recognized by the heat-shock protein family A [Hsp70] member 8 (HSPA8/HSC70) and co-chaperones^{9,10}. The substrate-chaperone complex then docks at the lysosomal membrane through specific binding to the cytosolic tail of the lysosomal associated membrane protein 2A (LAMP2A), the limiting and essential protein for CMA¹¹. LAMP2A then organizes into a multimeric complex that allows substrate to translocate across the lysosomal membrane^{12,13}, where it is degraded by acid hydrolases.

The first studies on CMA relied mainly on *in vitro* measurements of the different steps of the process on isolated lysosomes¹⁴⁻¹⁷. Although these experiments provided major advances in our understanding of the detailed processes involved in CMA as well as their regulation at the whole tissue level, they failed to provide insights at the cellular level and/or to discriminate cell type differences in CMA. A significant step forward in the field was then reached with the development and validation of a fluorescent CMA reporter system, which allowed monitoring of CMA activity in living cells¹⁸. The CMA reporter can be used in a broad variety of cells, and it became clear that levels of basal and inducible CMA activity are cell-type dependent¹⁸. However, the use of this reporter was limited to *in vitro* models and studies on animal tissues, which still relied on the measurement of CMA activity on isolated lysosomes, remained unanswered with regard to cell type-dependent differences in CMA inside tissues. This marked a second critical step in CMA research, with the recent development and validation of a

transgenic mouse model ubiquitously expressing a fluorescent CMA reporter (KFERQ-Dendra) that allows monitoring and quantifying this process *in vivo* at cellular resolution¹⁹. Although generated only recently, this model already contributed significantly to a more in-depth understanding of the properties and regulation of this form of autophagy^{19–22}.

Alongside these advances, the recent discovery of the existence of CMA in fish^{23,24} opened up new and exciting avenues in the field through the possibility of using complementary and powerful genetic models, such as zebrafish or medaka, for studying this fundamental function. In particular, it allows benefiting from the numerous advantages offered by these models (high number of offspring, transparency of the young stages allowing live fluorescent imaging, fully sequenced genome, ease of gene editing...) to expand our basic knowledge of CMA at multiple organismal levels, including that of single cell, whole tissues and organism, as already demonstrated in many fields of biology²⁵.

In this context, the aim of the present study was to determine to what extent these expectations are grounded and thus to validate the zebrafish as a relevant and powerful complementary model to study CMA. We first tested the fluorescent CMA reporter system - previously developed to track CMA in mammalian cells^{18,19} - in zebrafish primary embryonic cells. Our results show that upon starvation and/or mild oxidative stress, the CMA reporter localizes to lysosomes in a KFERQ- and Lamp2a-dependent manner, providing unequivocal evidence for the existence of a functional CMA process in this fish species, as previously demonstrated in medaka fish²³. We then developed a KFERQ-Dendra2 transgenic reporter zebrafish line and demonstrated that it allows tracking as well as discriminating cell type differences in basal and inducible CMA inside tissues. It thus represents a new complementary model to the recently developed KFERQ-Dendra mouse¹⁹. Lastly, in an effort to demonstrate the significance of the KFERQ-Dendra CMA reporter zebrafish line, we identified a previously unknown spatial distribution of CMA activity in the testes, and revealed an unexpected role for this function in gametogenesis. Collectively, these results validate the KFERQ-Dendra transgenic zebrafish as a reliable model to improve our understanding of the pathophysiology mechanisms involved in CMA (dys)functions. Besides, the recent development of numerous small molecule screening assays in zebrafish hints at the strong promise of our line to discover and test new therapeutic agents targeting CMA.

RESULTS

Zebrafish cells displays CMA activity

To address the existence of CMA or a CMA-like process in zebrafish we first adapted and validated - in zebrafish - the use of a fluorescent CMA reporter (KFERQ-Dendra2), which has proven to be a reliable reporter for tracking and measuring CMA activity in mammals^{18,19}. This reporter consists of the N-terminal 21 amino acids of bovine RNase A, including its KFERQ-CMA targeting motif (highly conserved among vertebrates), fused to the photo-convertible fluorescent protein Dendra2. Activation of CMA activity (for instance after prolonged starvation or under oxidative stress) induces re-localization of the fluorescent reporter from a cytoplasmic diffuse distribution to clearly identifiable and easily quantifiable puncta that co-localize within lysosomes¹⁸. After micro-injection of KFERQ-Dendra2-coding mRNAs in just fertilized zebrafish embryos, cells from 50% epiboly staged embryos were isolated and photoactivated with a 405 nm light emitting diode for 10 min (Figure 1A). Cells were then maintained for 16h with (Serum+) or without serum (Serum-), in presence or absence of hydrogen peroxide (H₂O₂). In control condition (Serum+), the reporter appeared diffusely localized throughout the cytoplasm with few if no puncta detected (Figure 1B; quantification in Figure 1C). In contrast, after starvation (Serum-) or upon H₂O₂ treatment (Serum+; H₂O₂ and Serum-; H₂O₂), cells displayed a significantly higher number of KFERQ-Dendra2 puncta (Figure 1B; quantification in Figure 1C), colocalizing together with the lysosomal marker Lamp1 (Figure 1D; quantification in Figure 1E).

In order to determine whether the observed puncta require the KFERQ-targeting motif, zebrafish cells were then micro-injected with mRNAs of a PA-Dendra2 construct lacking the KFERQ motif or a mutant reporter with a non-functional KFEAA-sequence replacing the KFERQ motif²⁶. Compared with the KFERQ-Dendra2 reporter (KFERQ (+)), both the Dendra2 alone (KFERQ (-)) and the mutant KFEAA-Dendra2 (KFEAA) remained mainly diffusely localized throughout the cytoplasm and showed no puncta after prolonged starvation (Figure 2F; quantification in Figure 2G), demonstrating that the formation of puncta depends on the presence of the KFERQ-motif.

In mammals, KFERQ-domain bearing proteins are additionally subjected to parallel degradation in late endosomes/multivesicular bodies through a pathway referred as endosomal Microautophagy (eMI)²⁷. However, unlike CMA, this process does not require LAMP2A, but

instead the “Endosomal Sorting Complex Required for Transport” (ESCRT) machinery²⁷. To determine the mechanisms behind the KFERQ-Dendra2 reporter dependent puncta formation observed in zebrafish cells, we therefore assessed the reporter behavior in cells from LAMP2A knockout (L2AKO) fish, generated using the genome-editing CRISPR-Cas9 tool (Figure S1A). More specifically, the produced fish displayed a deletion of a 737-bp region in exon 6 of the *lamp2* gene that encodes for the specific cytosolic and transmembrane domains of the Lamp2a protein (Figures S1B and S1C). Levels of lamp2a mRNA were undetectable in these cells, whereas those of others lamp2 splice-variants transcripts were comparable with their wild-type counterparts (Figure S1D). After 16 h starvation (serum-), the KFERQ-reporter appeared diffusely localized throughout the cytoplasm in L2AKO cells and no puncta was detectable (Figure 2H; quantification in Figure 2I).

Starvation and H₂O₂ activate macroautophagy in zebrafish as well^{28,29}. To determine whether the observed puncta requires macroautophagy, we used antisense morpholino oligonucleotides (MOs) to inhibit translation of zebrafish mRNAs encoding the E1-like enzyme Atg7, a core macroautophagy-related factor involved in the conjugation of Atg5 to Atg12. As expected, atg7 MO injection led to loss of Atg12–Atg5 complex formation, indicating efficient knockdown of Atg7 protein expression (Figures S2A and S2B). However, this loss of Atg7 did not affect the induction of puncta by 16 h starvation (Figure 2J; quantification in Figure 2K).

The entire CMA process, however, encompasses not only the recruitment of the KFERQ domain containing substrate to the lysosomal membrane but also its translocation and degradation into the lumen. To assess the lysosomal internalization and degradation of the CMA reporter upon starvation, we monitored the temporal changes in the number of fluorescent puncta, which is expected to decrease as the protein is internalized and degraded in this compartment. The strong reduction in the number of puncta/cell observed upon long-term serum removal (40h) compared with cells starved for a shorter time (16h) supports that the reporter undergoes degradation over time (Figure 2L, quantification in Figure 2M). In this sense, inhibition of lysosomal proteases by leupeptin+NH₄Cl treatment induced a significant increase in the number of puncta upon serum depletion (Figure 2N, quantification in Figure 2O).

Together, these results support the existence in zebrafish of a pathway that, upon fasting and/or oxidative stress specifically targets KFERQ-proteins in a Lamp2a-dependent manner, similarly to the previously defined CMA in mammals and more recently in medaka²³.

The zebrafish KFERQ-Dendra2 line as a new model to study CMA *in vivo*

The identification of CMA activity in zebrafish now opens up the possibility of using this species - a powerful model organism for functional studies - to improve our fundamental understanding of this function. To this end, we generated a transgenic zebrafish line ubiquitously expressing the fluorescent CMA reporter KFERQ-Dendra2 described above and which, in mammals, has proven to be a reliable reporter for monitoring and measuring CMA activity *in vivo* as well¹⁹. In details, we used a vector suitable for *in vivo* expression using the 3167 plasmid backbone and inserting the oligonucleotide coding for the N-terminal sequence of the bovine ribonuclease A containing the KFERQ-CMA targeting motif in frame with the sequence of the photo-convertible fluorescent protein Dendra2 under the ubiquitin promoter that provides ubiquitous expression (*Figure 2A*). As expected, when not photoactivated, KFERQ-Dendra2 fish ubiquitously emitted green fluorescence (emission collected at 507 nm after 488 nm excitation) but not red fluorescence (emission collected at 576 nm after 561 nm excitation) (*Figures 2B1 and 2B2*). In contrast, following photoactivation at 405 nm, KFERQ-Dendra2 fish emitted also red fluorescence in all tissues examined, in support of an ubiquitous expression of the CMA reporter (*Figures 2B3-2B8*).

To determine the possibility of visualizing changes in CMA activity at the cellular level within tissues using the zebrafish KFERQ-Dendra2 reporter line, we first sampled kidneys – known to present high basal and induced CMA activity in mammals¹⁹, and displaying high LAMP2A mRNA expression in zebrafish (*Figure 2C*) – from fed and starved fish. Accordingly, analysis of the kidney from the KFERQ-Dendra2 zebrafish, revealed the presence of discrete CMA reporter-positive puncta in tubules (*Figures 2D1 and 2D2*). At closer look, we found that, in fed fish, the CMA puncta were sparsely detected (*Figures 2E1 and 2E2*). In contrast, kidneys sampled from starved fish displayed a significantly higher number of KFERQ–Dendra2 puncta in tubules (*Figures 2E3-2E5*; quantification in *Fig 2F*), mainly located at the perinuclear region (*Figures 2G1 and 2G2*), known to be abundant in lysosomes^{30,31}. In this regard, we found that the fluorescent CMA puncta co-localized together with the LysoTracker (*Figures 2H1-2H3*), further supporting a lysosomal localization of the reporter. We also confirmed that the expression of KFERQ-Dendra2 mRNA remained unchanged upon starvation, indicating that the changes observed in the number of puncta between fed and starved fish were not a consequence of changes in the CMA reporter transgene expression (*Figure S3A*).

In order to provide further validation of the selectivity of the reporter zebrafish model for CMA, we then crossed KFERQ-Dendra2 zebrafish with our L2AKO line. Kidney from KFERQ-Dendra-L2AKO fish displayed no fluorescent puncta either in fed or fasted condition (Figures 2I1 – 2J2 and Video S3B), while the total number of the lysosomes in these cells were not affected (Figures J3 and J4). Finally, we also confirmed that there was no difference in KFERQ-Dendra2 mRNA expression between the WT and L2AKO CMA reporter fish, indicating that the lack of puncta in the latter is not a consequence of a lack of CMA reporter transgene expression (Figure S3A).

Together, these data demonstrate that the KFERQ-Dendra2 protein expressed in our CMA reporter zebrafish line relocates upon starvation from a cytoplasmic diffuse distribution to puncta that co-localize with lysosomes in a Lamp2a-dependent manner. As such, this zebrafish KFERQ-Dendra2 line allows monitoring cell type differences in basal and inducible CMA inside the same tissue. It thus represents a new complementary model to the recently developed CMA reporter mouse¹⁹ for studying this fundamental function by benefiting from the many advantages offered by this species (high number of offspring in each generation, transparency of the young stages allowing live fluorescent imaging, fully sequenced and annotated genome, ease of gene editing...) and from an evolutionary perspective.

Using the zebrafish CMA reporter to highlight a new role for this function in spermatogenesis

Despite recent evidence of increased levels of LAMP2A and HSC70 in the testes of the *Stra8-cre;Foxj2^{tg/tg}* sterile mice model³², there is no current information on the role of CMA in spermatogenesis. Analysis of testes of KFERQ-Dendra zebrafish revealed low basal CMA activity in this tissue but a 3-fold increase in the number of fluorescent puncta after starvation (Figures 3A1 – 3A6; quantification in Figure 3A7), located in specific cells surrounding the germ cells known as Sertoli cells (Figure 3B1 – 3B4). Interestingly, a recent evolutionary study of single-nucleus transcriptome data for testes from eleven species that covers the three major mammalian lineages (eutherians, marsupials, egg-laying monotremes) and birds, and includes seven key primates, showed that the *lamp2* gene is predominantly expressed in Sertoli cells in all species analyzed (except in mouse, which show a different expression profile), suggesting a strong conservation of the expression profile of this gene across evolution (Figure S4A reproduced with permission from Murat et al.³³).

Given the major role of Sertoli cells in supporting and orchestrating the development of germ cells into mature spermatozoa in the adult gonad³⁴, we sought to determine the consequences of LAMP2A invalidation on testicular development and function. H&E staining of testes sections from WT and L2AKO fish first revealed that the latter exhibit significantly higher sperm counts than their WT counterparts (Figures 4A1-4A8; quantification in Figure 4B). We then performed a comparative transcriptomics of testes of both lines and found that mRNA expression levels of different factors involved in dynein-complex assembly (DNAAF3, DNAI3/WDR63) and actin filament remodeling (Eps811a, lima1a) differ significantly between Control and L2AKO fish (Figure 4C and Table S1). These observed changes prompted us to assess swimming phenotypes of sperms from L2AKO fish, as defects in the assembly of axonemal dynein arms as well as in actin filament remodeling have been shown to cause dysmotility in sperm cells^{35,36}. In this aim, we used the automated reproducible computer-assisted sperm analysis (CASA) system that can provide objective and precise information on the kinetic of sperm cells. Interestingly, we showed a clear reduction in the percentage of motile sperm from L2AKO fish compared to those from WT (Figures 4D1-4D3 and Video S4B). Likewise, several parameters including the average path velocity (VAP), the curvilinear velocity (VCL) as well as the straight velocity (VSL) gave lower values for L2AKO sperm than for their WT counterpart (Figure 4E1 - 4E4). Together, these results highlight a previously unknown role for CMA in the production of active spermatozoa.

To unveil how LAMP2A deficiency leads to the profound phenotypic changes observed, we performed a quantitative proteomic analysis of sperm from WT and L2AKO fish. Overall, we identified 2887 proteins, among which 6.03% (174 proteins) were significantly downregulated and 3.53% (102 proteins) were significantly upregulated in L2AKO sperm compared to WT (Figure 5A1 and Tables S2 and S3). Gene Ontology analysis revealed that the most downregulated biological processes are associated with negative regulation of peptidase activity and lipid transport (Figure 5A2). Upon closer examination, we observed that the downregulated proteins predominantly comprise a subset of proteins identified as acute phase proteins (APPs), which are often implicated in inflammatory responses^{37,38} and include proteinase inhibitors (e.g., SERPIN- and FETUIN-families member proteins), apolipoproteins, complement components, transferrin, and hemopexin (Figure 5B and Table S2). Given the pivotal role that APPs play in safeguarding sperm integrity³⁹, the diminished expression of these proteins in L2AKO spermatozoa, in comparison to the control group, potentially signifies a compromised quality of the former. Interestingly, the Gene Ontology analysis also highlighted

that the most upregulated process was the mitochondrial respiratory chain (Figure 5A3). In detail, several subunits of mitochondrial Complex I (NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 6 (NDUA6)), complex III (Cytochrome b-c1 complex subunit 8 (UQCRQ), Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske (UQCRFS1)) and complex IV (cytochrome c oxidase subunit 4 (COX4), cytochrome c oxidase subunit 6A1 (COX6A1)), were found to be increased upon inactivation of Lamp2A (Figure 5B and Table S3). Notably, complement component 1 Q binding protein (C1QBP), which has previously been shown to critically supports translation of the mitochondrially encoded respiratory chain protein complexes I, III, IV and V⁴⁰, was also overexpressed in L2AKO fish spermatozoa, strengthening the hypothesis that the low L2AKO sperm motility observed may be related to perturbations in mitochondrial respiration. To test this assumption, we assessed mitochondrial membrane potential (MtMP), a global indicator of mitochondrial function. Sperm MtMP was determined using the membrane-permeant JC-1 dye and flow cytometry (Figures 5C and 5D1-5D2). We found a significantly lower total MtMP in L2AKO spermatozoa than in their WT counterparts (Figure E), and conversely a higher percentage of depolarized mitochondria in the former group compared to the latter (Figure F), supporting that the low L2AKO sperm motility observed may indeed be related to perturbations in mitochondrial respiration. Collectively, data gathered by quantitative proteomic analysis provide compelling evidence that the absence of Lamp2A triggers substantial reconfigurations within the spermatozoa proteome. Furthermore, they suggest a pivotal role for CMA in governing mitochondrial metabolism within sperm cells. Notably, using the KFERQ finder V0.8 application⁴¹ to examine CMA-targeting motifs within the sequences of the 102 proteins up-regulated in L2AKO spermatozoa, we found that most (67%) mitochondria-related proteins display at least one KFERQ-like motif (Figure 5G1 and Table S4), underscoring the plausible direct engagement of CMA in orchestrating their turnover. Similarly, 80% of the other (non-mitochondrial) up-regulated sperm proteins exhibited at least one KFERQ-like motif (Figure 5G2 and Table S4), making them potential candidates as CMA substrates. Overall, these results emphasize a previously unknown and critical function for CMA as a gatekeeper of sperm cells proteostasis and quality.

DISCUSSION

Recently, our research revealed the presence of functional CMA activity in two distinct fish species: the model fish medaka (*Oryzias latipes*), as reported by Lescat et al. in 2020²³, and subsequently, the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), as documented by Velez et al. in 2023⁴². These discoveries represented a significant milestone in our understanding of the evolutionary history of CMA, shedding light on its presence and functionality from the onset of vertebrates. Dysregulation or malfunction of CMA has been linked to the development of various human pathologies, including neurodegenerative diseases, cancers, and immune disorders¹. Understanding the role of CMA in fish, which share evolutionary and physiological similarities with humans, offers a promising platform for elucidating the molecular mechanisms underlying these pathologies.

Building upon our pioneering works, we have extended our exploration to reveal that CMA is not limited to medaka and trout, but is also operative in a widely studied model organism: the zebrafish (*Danio rerio*). This revelation not only broadens our understanding of this essential cellular process, but also capitalizes on the unique advantages and tools that this model organism offers, such as low cost feeding and maintenance, large numbers of offspring, rapid development *ex utero*, amenability to genetic and chemical screens, and optical transparency of embryos and larvae which facilitates noninvasive visualization of organs and biological processes *in vivo*⁴³. This newfound knowledge promises to accelerate discoveries in the field of autophagy and may ultimately lead to therapeutic interventions for CMA-related diseases.

In the present study, we took a significant step forward by developing a zebrafish transgenic line tailored for the precise monitoring of CMA activity within tissues at the cellular resolution. Through image-based analyses, we were able to demonstrate with great precision the presence of fasting-inducible CMA activity in specific cell types, such as renal tubules - as previously reported in the KFERQ-Dendra mouse model¹⁹ - or unexpectedly, in Sertoli cells. These results therefore attest to the strong potential of this zebrafish CMA reporter line as a complementary model to the KFERQ-Dendra mouse for studying this function in organs with complex cellularity, benefiting from all the advantages described above.

In this regard, a remarkable discovery emerging from our investigation is the unexpected role of CMA in spermatogenesis and sperm motility. As previously mentioned, our imaging analyses of the KFERQ-Dendra2 zebrafish line unveiled the presence of discrete yet highly

specific CMA activity within a particular cell type in male gonads, referred to as Sertoli cells. Given the pivotal role of these cells in supporting and nurturing germ cell development in the adult gonads⁴⁴, we conducted an assessment of spermatozoa 'quality' in L2AKO zebrafish in comparison to the WT. Our findings revealed a noticeable reduction in sperm motility in L2AKO fish when compared to their WT counterparts, and suggest that defects in the mitochondrial respiratory chain may underlie, at least in part, this effect. Mitochondria play a pivotal role in germ cell development and any defects in mitochondrial quality can have serious consequences on male fertility⁴⁵. In this regards, several studies established a good correlation between sperm motility and both MtMP and the mitochondrial respiratory complex activities⁴⁶. As mitochondria are the major source of pro-oxidative agents, it is suggested that dysfunction of this organelle would have a fundamental role in the oxidative imbalance affecting sperm function⁴⁷. Wang et al. thus identified low MtMP and high reactive oxygen species (ROS) production in spermatozoa from infertile patients, probably as a consequence of such mitochondrial injury⁴⁸. Mitochondria are also critical for sperm metabolism and energy production⁴⁹, and defects in mitochondria have been shown to affect energy furniture for sperm motility⁵⁰. Collectively, these data designate mitochondria as a key organelle for sperm motility. In this context, it is tempting to speculate that the reduction in sperm motility observed in L2AKO fish is linked, at least in part, to defects in mitochondrial activity. Recent research has already highlighted the role of CMA in controlling the levels of several proteins involved in mitochondrial functions⁵¹⁻⁵³. However, to the best of our knowledge, our findings represent the first evidence that this effect could affect male reproduction. Future research will be essential to further elucidate this relationship between CMA, mitochondria and sperm motility.

In summary, this article approaches the study of CMA from an entirely new and innovative angle, spanning from the initial discovery of CMA activity in zebrafish to the development of a specialized transgenic line - that allows determining and tracking the spatiotemporal dynamic changes of CMA activity *in vivo* - and culminating in the revelation of CMA's pivotal role in reproductive processes. Overall, our work not only expands the frontiers of knowledge surrounding CMA but also underscores its relevance in a broader biological context, with potential implications for both fundamental research and reproductive health studies.

MATERIALS AND METHODS

Zebrafish breeding and treatments

Adult zebrafish male and female were used. Fish were grown at 27°C under a 12h photoperiod time (12h in light, 12h in dark). They were fed 3 times a day with commercial breeding. During treatments, fish were starved for 48h. For organs sampling, zebrafish were euthanized in a lethal dose of Tricaine (MS-222). All experimental procedures were conducted in strict accordance with the legal frameworks of France and the European Union. They respect the directive 2010/63/EU relating to the protection of animals used for scientific purposes as well as the decree No 2013-118, February 1, 2013, of the French legislation governing the ethical treatment of animals.

Construction of CMA reporter plasmids and design of morpholino antisense oligonucleotide

The PA-mCherry1-N1 vector was a gift from Michael Davidson (Addgene, 54507; <http://n2t.net/addgene:54507>; RRID: Addgene_54507; deposited by Michael Davidson), and from this we generated a KFERQ-PA-mCherry1 construction composed by the N-terminal 21 amino acids of bovine RNASE1/RNase A containing its KFERQ CMA-targeting motif, fused to the photoactivable-mCherry1 (PA-mCherry1) protein, as originally reported by Koga et al (Koga et al., 2011). The functionality of our construct has recently been validated in fish cells (Lescat et al., 2020; Velez et al., 2023). The pKFERQ–Dendra2 plasmid was constructed by inserting the oligonucleotide coding for the N-terminal sequence of the bovine ribonuclease A containing the KFERQ-CMA targeting motif (MKETAAAKFERQHMDSSSTAA) into the p3167 vector (gifted from Pr Larazo Centanin in Centre of Organismal Studies in Heidelberg, Germany). The LAMP1-GFP construct was a gift from Benjamin Dehay (Univ. Bordeaux, INSERM, France).

Anti-ATG7 Morpholino oligonucleotide (MO) (AGCTTCAGACTGGATTCCGCCATCG) was previously described in (Lee and al., 2014) and designed with Gene Tools, to directly target Atg7 protein. Embryos were injected at the 1-cell stage with 1 mM. MO action were confirmed by Atg5/Atg12 formation in cells by Western blotting.

CMA activity assay in zebrafish primary embryonic cells

To track and quantify CMA activity, embryos were micro-injected with a KFERQ-Dendra2 RNA, KFERQ-PA-mCherry or Lamp1-GFP during one cell stage. After 8 hours of development, at 50% epiboly, cells were isolated and plated into culture in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), with 10% FBS (Foetal Bovine Serum) and 5% antibiotics (Streptomycine). During the treatments, cells were cultured at 25°C and were incubated in a serum-free DMEM (Serum-) or in combination with 25µM of H₂O₂. Then, cells were photoconverted by a 405 nm laser for 10 minutes at 2,80A, and cells were then maintained in medium culture for 16h. To check for lysosomal translocation, protease inhibitors were used, with 50nM Leupeptin and 50nM NH₄Cl.

Establishment of the Lamp2A-KO Zebrafish line and the KFERQ-Dendra2 Zebrafish line

Zebrafish deleted for Lamp2a were generated using the CRISPR/Cas9 method. Guide RNAs (sgRNAs) targeting two sites located before and after Lamp2a exon were designed using ZiFiT software (<http://zifit.partners.org/ZiFiT/Disclaimer.aspx>). DR274 vector (Addgene #42250) containing the guide RNA sequence was first linearized with Bsa1, electrophoresed in a 2% agarose gel and purified. PCR amplifications were then performed using linearized DR274 as a template and two primers for each sgRNA. Forward primers containing sgRNAs target sequences (in red and bolded in Fig.S1C). Forward primer: 5'-GAAATTAATACGACTCAC TATA**gtgtaaatgtcactaaagtc**GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG-3'. Reverse primer: 5'-GAAATTAATACGACTCACTATA**gttctgttgatcta**acatGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG-3'.

The sgRNAs were co-injected with Cas9 protein. Synthesized RNAs were then injected into 1-cell stage zebrafish embryos at the following concentrations: 25 ng/mL for each sgRNA and 100 ng/mL for the Cas9 protein. Genotyping was performed on gDNA from caudal fin-clips of adult fishes. CRISPR-positive fish were screened for mutations using a set of PCR primers (Forward primer: 5'-CGTCAATTTACTGCTACTCTAGCC-3'; Reverse primer: 5'-TTATACAGACTGGTAACCAGTACG-3') (Fig. S1C) flanking the sgRNAs target sites leading to a 737 bp deletion on the exon 6A of the Lamp2 gene (Fig. S1B).

KFERQ-Dendra2 and KFERQ-mCherry zebrafish reporter lines were generated by injecting the previously described plasmids into 1-cell zebrafish embryos. These plasmids contain a crystalline Beta cassette, which was used to select fish that had integrated the plasmid by fluorescence in the eye. Once adult, these fish were crossed with each other to obtain global reporter fish due to the ubiquitin promoter.

Microscopy imaging

Images of cells were taken in the MRic Photonics platform (Biosit Rennes) with a DeltaVision Elite high-resolution microscope equipped with a 60X oil objective lens (GE Healthcare). Images were spliced into different channels and we applied a filter (plugin) with Image J (<https://fiji.sc/> RRID:SCR_002285) to directly quantify the puncta from the reporter. Images from tissues were taken using a LEICA confocal microscope SP5 with a 40X oil objective lens. Images were processed using LAS-AF software (Leica Microsystems).

Lysosomal content

Acidic vesicles were controlled between the Wild-Type and LAMP2A-KO cells using either Lamp1-GFP by microinjection in a one cell stage zebrafish embryo, or by incubating cells and tissues in LysoTracker Deep Red DND-26 (Invitrogen) for 30 minutes at 75nM, and were then observed by microscopy and quantify by Image J.

Sperm motility

Male Zebrafish were isolated the day before sampling. The day after, they were anesthetized and sperm sampling were done directly by aspiration. Sperm were then diluted in HBSS (Hanks' balanced salt solution) at 300 μ M and conserved in ice to reduce their motility. They were displayed in the CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) and motilities were recorded using the module IVOS II (IMV technology) and the camera ISAS 782M camera recorder. Range size particles were defined between 2 and 20 μ m in the CASA settings.

The parameters considered in this study were: total motility (MOT, %); the percentage of fast (average path velocity [VAP] >100 mm/s), medium (VAP $\frac{1}{4}$ 50–100 mm/s), and slow (VAP $\frac{1}{4}$ 10–50 mm/s) spermatozoa; curvilinear velocity (VCL, in mm/s), defined as the time/average

velocity of a sperm head along its actual curvilinear trajectory; straight line velocity (VSL, mm/s), defined as the time/average velocity of a sperm head along the straight line between its first detected position and its last position; VAP (mm/s), defined as the time/average of sperm head along its spatial average trajectory; straightness (STR, %), defined as the linearity of the spatial average path, VSL/VAP^{54} . At least 400 spermatozooids were counted in each sample.

Mitochondrial Assay

Male Zebrafish were isolated the day before sampling. The day after, they were anesthetized and sperm sampling was done directly by aspiration. Sperm were then diluted in a HBSS solution at 300 μ M and conserved in ice. Then, sperm were incubated with 50 nM of JC-1 labelling (Invitrogen) for 15 minutes at 20°C. Control was performed by adding the same amount of DMSO in sperm. They were observed in flux cytometry and each sample was measured in triplicate with 3 different experiments.

Histological preparations

Testis sampling were fixed in Bouin at 4°C for overnight under shaking. After several dehydration bath of croissant ethanol concentrations (25%, 50%, 70%, 96%), tissues were flushed in PBS, covered in paraffin and then sectioned in 5 nm by microtome. The sections were mounted in glasses and stained with hematoxylin and eosin. The various cell stages were counted using Fiji and the Stardist plugin. Score threshold was set to 0,5 and the overlap threshold to 0,4.

Quantitative RT-PCR analysis

For RNA extraction, tissues from 6 different zebrafish were pooled in each condition and we used TriZol protocol to extract total RNA (Invitrogen, Carlsbad, California, USA). The protocol conditions for sample preparation and quantification have been previously detailed (Seiliez and al, 2016). The primer used for RT-PCR were listed in Table S5. The relative quantification of target genes expression was calculated using the deltaCT method and 18S was used as housekeeping gene. Samples were analysed in triplicates.

Bulk RNA barcoding and sequencing (BRB-seq) analysis

Testes were collected from wild type and LAMP2A-KO adult males, under fed and fasting conditions. We used the Trizol protocol to extract RNA. After Nanodrop quantification, the concentration of each sample was adjusted to 50 ng. Samples were then sent to Alithea Genomics S.A. First, the RNAs were barcoded and then retrotranscribed. Once synthesized, the second strand is synthesized. These cDNA strands were then segmented and labelled. From these DNA fragments, the fragments were amplified and 2 libraries were created. The first contains only barcode sequences and unique molecular identifiers (UMIs). The second contains all the RNA fragment sequences produced by Illumina. From here, the sequencing data are analysed, the UMIs are counted and a gene-counting matrix is set up. Next, a demultiplexing step is required to match the codes in the first library with the sequences in the second, and also with the reference zebrafish genome, and was done by R script. Significance level was set at $p < 0.05$, and ratios (Fold change, FC) were considered relevant if higher than ± 1 .

Protein extraction, western blotting and quantitative proteomics

Proteins were collected using RIPA buffer (ThermoFisher Scientific, 89901) supplemented with protease and phosphatases inhibitor cocktail (ThermoFisher Scientific, 78422). Protein concentration was determined using the Qubit protein assay kit (ThermoFisher Scientific, Q33211).

For Western blot analyses, the samples were then electrophoresed by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Afterwards, proteins were transferred to polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes (Merk-Millipore, IPFL00010), blocked with SuperBlock Blocking Buffer in PBS (Thermo Scientific, 37515), and immunoblotted following the manufacturer's protocol and the following antibodies: The different immunoreactive bands were developed using the SuperSignal West Pico Plus Chemiluminescent Substrate (ThermoFisher Scientific, 34578). Signal acquisition was performed using Smart Exposure in an iBright FL1500 Imaging System (ThermoFisher Scientific, Illkirch Cedex, France) to assure signal linearity, and then images were quantified with the iBright Analysis Software (ThermoFisher Scientific, RRID:SCR_017632).

For quantitative proteomic analysis, 50 μg of protein extract from a pool of 5 individual fish with 5 replicates per condition were extracted and shipped to the ProteoToul Services -

Proteomics Facility of Toulouse (<https://proteotoul.ipbs.fr/proteotoul-services/>) for posterior analysis. Briefly, 50 µg of dried protein extracts from each sample were solubilized with 25 µl of 5% SDS. Proteins were submitted to reduction and alkylation of cysteine residues by addition of TCEP and chloroacetamide to a final concentration respectively of 10 mM and 40 mM. Protein samples were then processed for trypsin digestion on S-trap Micro devices (Protifi) according to manufacturer's protocol, with the following modifications: precipitation was performed using 216 µl S-Trap buffer, 4 µg trypsin was added per sample for digestion in 25 µl ammonium bicarbonate 50 mM. After that, tryptic peptides were resuspended in 35 µl of 2% acetonitrile and 0.05% trifluoroacetic acid and analyzed by nano-liquid chromatography (LC) coupled to tandem mass spectrometry (MS), using an UltiMate 3000 system (NCS-3500RS Nano/Cap System; ThermoFisher Scientific) coupled to an Orbitrap Exploris 480 mass spectrometer equipped with a FAIMS Pro device (ThermoFisher Scientific). 1 µg of each sample was injected into the analytical C18 column (75 µm inner diameter × 50 cm, Acclaim PepMap 2 µm C18 ThermoFisher Scientific) equilibrated in 97.5% solvent A (5% acetonitrile, 0.2% formic acid) and 2.5% solvent B (80% acetonitrile, 0.2% formic acid). Peptides were eluted using a 2.5% - 40% gradient of solvent B over 62 min at a flow rate of 300 nL/min. The mass spectrometer was operated in data-dependent acquisition mode with the Xcalibur software. MS survey scans were acquired with a resolution of 60,000 and a normalized AGC target of 300%. Two compensation voltages were applied (-45 v/-60 v). For 0.8 s most intense ions were selected for fragmentation by high-energy collision-induced dissociation, and the resulting fragments were analyzed at a resolution of 30,000, using a normalized AGC target of 100%. Dynamic exclusion was used within 45 s to prevent repetitive selection of the same peptide. Thereafter, raw mass spectrometry (MS) files were processed with the Mascot software (version 2.7.0) for database search and Proline55 for label-free quantitative analysis (version 2.1.2). Data were searched against zebrafish entries of Uniprot protein database. Carbamidomethylation of cysteines was set as a fixed modification, whereas oxidation of methionine was set as variable modifications. Specificity of trypsin/P digestion was set for cleavage after K or R, and two missed trypsin cleavage sites were allowed. The mass tolerance was set to 10 ppm for the precursor and to 20 mmu in tandem MS mode. Minimum peptide length was set to 7 amino acids, and identification results were further validated in Proline by the target decoy approach using a reverse database at both a PSM and protein false-discovery rate of 1%. For label-free relative quantification of the proteins across biological replicates and conditions, cross-assignment of peptide ions peaks was enabled inside group with a match time

window of 1 min, after alignment of the runs with a tolerance of +/- 600 s. Median Ratio Fitting computes a matrix of abundance ratios calculated between any two runs from ion abundances for each protein. For each pair-wise ratio, the median of the ion ratios is then calculated and used to represent the protein ratio between these two runs. A least-squares regression is then performed to approximate the relative abundance of the protein in each run in the dataset. This abundance is finally rescaled to the sum of the ion abundances across runs. A Student T-test (two-tailed t-test, equal variances) was then performed on log₂ transformed values to analyze differences in protein abundance in all biologic group comparisons. Significance level was set at $p < 0.05$, and ratios (Fold change, FC) were considered relevant if higher than +/- 1.25.

The list of proteins identified in the present study is provided in Tables S2 and S3 along with the FC (log₂ transformed) and p-value (log₁₀ transformed) results of the down- and up-regulated proteins in L2AKO vs WT fish. Gene Ontology enrichment maps were then generated using Enrichr^{55,56}. Finally, the presence of KFERQ motifs within the protein sequences was assessed using the KFERQ finder app V0.8⁴¹, and data is presented in Table S4.

Statistical analysis

All data are reported as means \pm SD or means of percentages \pm SD from a minimum of 3 independent experiments. Normality of data residuals were verified before performing parametric or non-parametric statistical tests. Except in Figure S4A for which Exact binomial tests were used, in all other cases, for comparison with more than 2 groups, one-way ANOVA analysis were performed followed by Tukey's multiple comparison (same sample size) or Bonferroni's multiple comparison (different sample size) post-hoc tests. For comparison between two groups, we used a parametric two-tailed unpaired Student's T-test, or a non-parametric Mann Whitney test. All statistical analyses were performed using GraphPad Prism version 8.0.1 for Windows (GraphPad Software, Inc., www.graphpad.com) and a p-value < 0.05 was set as a level of significance.

END NOTES

Supplementary information is available in the online version of the paper

Acknowledgements

We thank X. Pinson and S. Dutertre (from Microscopy Rennes Imaging Center, MRic) for their technical assistance. We thanks Alexandre Stella from the ProteoToul Services - Proteomics Facility of Toulouse for the proteomics analysis. We also thanks L. Peron for manufacturing the light emitting device. This research was supported by the Communauté d'Agglomération Pays Basque (CAPB).

Author Contributions

A.H. and I.S. got the funding. M.G., A.H. and I.S. conceived and planned the study as well as all the experiments. M.G., E.J.V., S.S., V.V, K.D., and A.D. performed the experiments. M.G., A.H. and I.S. analyzed the data. M.G. and I.S. wrote the original draft of the manuscript. I.S., A.H., F.B., E.J.V., and S.S. reviewed and edited the final version of the manuscript. I.S. and A.H. supervised the project and had primary responsibility for final content.

Disclosure statement

The authors declare no competing financial interests.

Data availability

The authors confirm that the data supporting the findings of this study are available within the article [and/or] its supplementary materials.

REFERENCES

1. Kaushik, S., and Cuervo, A.M. (2018). The coming of age of chaperone-mediated autophagy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *19*, 365–381. 10.1038/s41580-018-0001-6.
2. Arias, E., and Cuervo, A.M. (2011). Chaperone-mediated autophagy in protein quality control. *Current Opinion in Cell Biology* *23*, 184–189. 10.1016/j.ceb.2010.10.009.
3. Schneider, J.L., Suh, Y., and Cuervo, A.M. (2014). Deficient chaperone-mediated autophagy in liver leads to metabolic dysregulation. *Cell Metab.* *20*, 417–432. 10.1016/j.cmet.2014.06.009.
4. Park, C., Suh, Y., and Cuervo, A.M. (2015). Regulated degradation of Chk1 by chaperone-mediated autophagy in response to DNA damage. *Nat Commun* *6*, 6823. 10.1038/ncomms7823.
5. Valdor, R., Mocholi, E., Botbol, Y., Guerrero-Ros, I., Chandra, D., Koga, H., Gravekamp, C., Cuervo, A.M., and Macian, F. (2014). Chaperone-mediated autophagy regulates T cell responses through targeted degradation of negative regulators of T cell activation. *Nat. Immunol.* *15*, 1046–1054. 10.1038/ni.3003.
6. Hu, M.-M., Yang, Q., Xie, X.-Q., Liao, C.-Y., Lin, H., Liu, T.-T., Yin, L., and Shu, H.-B. (2016). Sumoylation Promotes the Stability of the DNA Sensor cGAS and the Adaptor STING to Regulate the Kinetics of Response to DNA Virus. *Immunity* *45*, 555–569. 10.1016/j.immuni.2016.08.014.
7. Xu, Y., Zhang, Y., García-Cañaveras, J.C., Guo, L., Kan, M., Yu, S., Blair, I.A., Rabinowitz, J.D., and Yang, X. (2020). Chaperone-mediated autophagy regulates the pluripotency of embryonic stem cells. *Science* *369*, 397–403. 10.1126/science.abb4467.
8. Yao, R., and Shen, J. (2023). Chaperone-mediated autophagy: Molecular mechanisms, biological functions, and diseases. *MedComm* (2020) *4*, e347. 10.1002/mco2.347.
9. Chiang, H.L., Terlecky, S.R., Plant, C.P., and Dice, J.F. (1989). A role for a 70-kilodalton heat shock protein in lysosomal degradation of intracellular proteins. *Science* *246*, 382–385. 10.1126/science.2799391.
10. Agarraberes, F.A., and Dice, J.F. (2001). A molecular chaperone complex at the lysosomal membrane is required for protein translocation. *Journal of Cell Science* *114*, 2491–2499. 10.1242/jcs.114.13.2491.
11. Cuervo, A.M., and Dice, J.F. (1996). A receptor for the selective uptake and degradation of proteins by lysosomes. *Science* *273*, 501–503. 10.1126/science.273.5274.501.
12. Bandyopadhyay, U., Kaushik, S., Varticovski, L., and Cuervo, A.M. (2008). The chaperone-mediated autophagy receptor organizes in dynamic protein complexes at the lysosomal membrane. *Mol. Cell. Biol.* *28*, 5747–5763. 10.1128/MCB.02070-07.
13. Bandyopadhyay, U., Sridhar, S., Kaushik, S., Kiffin, R., and Cuervo, A.M. (2010). Identification of regulators of chaperone-mediated autophagy. *Mol. Cell* *39*, 535–547. 10.1016/j.molcel.2010.08.004.
14. Aniento, F., Roche, E., Cuervo, A.M., and Knecht, E. (1993). Uptake and degradation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by rat liver lysosomes. *Journal of Biological Chemistry* *268*, 10463–10470. 10.1016/S0021-9258(18)82222-0.
15. Cuervo, A.M., Terlecky, S.R., Dice, J.F., and Knecht, E. (1994). Selective binding and uptake of ribonuclease A and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by isolated rat liver lysosomes. *Journal of Biological Chemistry* *269*, 26374–26380. 10.1016/S0021-9258(18)47204-3.
16. Cuervo, A.M., Knecht, E., Terlecky, S.R., and Dice, J.F. (1995). Activation of a selective pathway of lysosomal proteolysis in rat liver by prolonged starvation. *Am. J. Physiol.* *269*, C1200-1208. 10.1152/ajpcell.1995.269.5.C1200.

17. Cuervo, A.M., Dice, J.F., and Knecht, E. (1997). A Population of Rat Liver Lysosomes Responsible for the Selective Uptake and Degradation of Cytosolic Proteins*. *Journal of Biological Chemistry* 272, 5606–5615. 10.1074/jbc.272.9.5606.
18. Koga, H., Martinez-Vicente, M., Macian, F., Verkhusha, V.V., and Cuervo, A.M. (2011). A photoconvertible fluorescent reporter to track chaperone-mediated autophagy. *Nat Commun* 2, 386. 10.1038/ncomms1393.
19. Dong, S., Aguirre-Hernandez, C., Scrivo, A., Eliscovich, C., Arias, E., Bravo-Cordero, J.J., and Cuervo, A.M. (2020). Monitoring spatiotemporal changes in chaperone-mediated autophagy in vivo. *Nat Commun* 11, 645. 10.1038/s41467-019-14164-4.
20. Dong, S., Wang, Q., Kao, Y.-R., Diaz, A., Tasset, I., Kaushik, S., Thiruthuvanathan, V., Zintiridou, A., Nieves, E., Dzieciatkowska, M., et al. (2021). Chaperone-mediated autophagy sustains haematopoietic stem-cell function. *Nature* 591, 117–123. 10.1038/s41586-020-03129-z.
21. Kaushik, S., Juste, Y.R., Lindenau, K., Dong, S., Macho-González, A., Santiago-Fernández, O., McCabe, M., Singh, R., Gavathiotis, E., and Cuervo, A.M. (2022). Chaperone-mediated autophagy regulates adipocyte differentiation. *Science Advances* 8, eabq2733. 10.1126/sciadv.abq2733.
22. Madrigal-Matute, J., de Bruijn, J., van Kuijk, K., Riascos-Bernal, D.F., Diaz, A., Tasset, I., Martín-Segura, A., Gijbels, M.J.J., Sander, B., Kaushik, S., et al. (2022). Protective role of chaperone-mediated autophagy against atherosclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 119, e2121133119. 10.1073/pnas.2121133119.
23. Lescat, L., Véron, V., Mourot, B., Péron, S., Chenais, N., Dias, K., Riera-Heredia, N., Beaumatin, F., Pinel, K., Priault, M., et al. (2020). Chaperone-Mediated Autophagy in the Light of Evolution: Insight from Fish. *Molecular Biology and Evolution* 37, 2887–2899. 10.1093/molbev/msaa127.
24. Herpin, A., Lescat, L., Bobe, J., Jenny, A., and Seiliez, I. (2020). Lighting chaperone-mediated autophagy (CMA) evolution with an ancient LAMP: the existence of a functional CMA activity in fish. *Autophagy* 16, 1918–1920. 10.1080/15548627.2020.1797344.
25. Lin, C.-Y., Chiang, C.-Y., and Tsai, H.-J. (2016). Zebrafish and Medaka: new model organisms for modern biomedical research. *J Biomed Sci* 23, 19. 10.1186/s12929-016-0236-5.
26. Chiang, H.L., and Dice, J.F. (1988). Peptide sequences that target proteins for enhanced degradation during serum withdrawal. *Journal of Biological Chemistry* 263, 6797–6805. 10.1016/S0021-9258(18)68713-7.
27. Sahu, R., Kaushik, S., Clement, C.C., Cannizzo, E.S., Scharf, B., Follenzi, A., Potalicchio, I., Nieves, E., Cuervo, A.M., and Santambrogio, L. (2011). Microautophagy of cytosolic proteins by late endosomes. *Dev. Cell* 20, 131–139. 10.1016/j.devcel.2010.12.003.
28. Fan, X., Hou, T., Zhang, S., Guan, Y., Jia, J., and Wang, Z. (2020). The cellular responses of autophagy, apoptosis, and 5-methylcytosine level in zebrafish cells upon nutrient deprivation stress. *Chemosphere* 241, 124989. 10.1016/j.chemosphere.2019.124989.
29. Imamura, S., Yabu, T., and Yamashita, M. (2011). Protective function of autophagy against oxidative stress in zebrafish. *The FASEB Journal* 25, 904.1-904.1. 10.1096/fasebj.25.1_supplement.904.1.
30. Heuser, J. (1989). Changes in lysosome shape and distribution correlated with changes in cytoplasmic pH. *Journal of Cell Biology* 108, 855–864. 10.1083/jcb.108.3.855.

31. Pu, J., Guardia, C.M., Keren-Kaplan, T., and Bonifacino, J.S. (2016). Mechanisms and functions of lysosome positioning. *Journal of Cell Science* *129*, 4329–4339. 10.1242/jcs.196287.
32. Bai, F.-R., Wu, Q.-Q., Wu, Y.-J., Hu, Y.-Q., Jiang, Z.-X., Lv, H., Qian, W.-Z., Cai, C., and Wu, J.-W. (2022). Germline FOXJ2 overexpression causes male infertility via aberrant autophagy activation by LAMP2A upregulation. *Cell Death Dis* *13*, 665. 10.1038/s41419-022-05116-w.
33. Murat, F., Mbengue, N., Winge, S.B., Trefzer, T., Leushkin, E., Sepp, M., Cardoso-Moreira, M., Schmidt, J., Schneider, C., Mößinger, K., et al. (2023). The molecular evolution of spermatogenesis across mammals. *Nature* *613*, 308–316. 10.1038/s41586-022-05547-7.
34. O'Donnell, L., Smith, L.B., and Rebourcet, D. (2022). Sertoli cells as key drivers of testis function. *Seminars in Cell & Developmental Biology* *121*, 2–9. 10.1016/j.semcd.2021.06.016.
35. Whitfield, M., Thomas, L., Bequignon, E., Schmitt, A., Stouvenel, L., Montantin, G., Tissier, S., Duquesnoy, P., Copin, B., Chantot, S., et al. (2019). Mutations in DNAH17, Encoding a Sperm-Specific Axonemal Outer Dynein Arm Heavy Chain, Cause Isolated Male Infertility Due to Asthenozoospermia. *Am J Hum Genet* *105*, 198–212. 10.1016/j.ajhg.2019.04.015.
36. Aprea, I., Raidt, J., Höben, I.M., Loges, N.T., Nöthe-Menchen, T., Pennekamp, P., Olbrich, H., Kaiser, T., Biebach, L., Tüttelmann, F., et al. (2021). Defects in the cytoplasmic assembly of axonemal dynein arms cause morphological abnormalities and dysmotility in sperm cells leading to male infertility. *PLoS Genet* *17*, e1009306. 10.1371/journal.pgen.1009306.
37. Jensen, L.E., Hiney, M.P., Shields, D.C., Uhlar, C.M., Lindsay, A.J., and Whitehead, A.S. (1997). Acute phase proteins in salmonids: evolutionary analyses and acute phase response. *J Immunol* *158*, 384–392.
38. Gabay, C., and Kushner, I. (1999). Acute-Phase Proteins and Other Systemic Responses to Inflammation. *N Engl J Med* *340*, 448–454. 10.1056/NEJM199902113400607.
39. Ciereszko, A., Dietrich, M.A., and Nynca, J. (2017). Fish semen proteomics — New opportunities in fish reproductive research. *Aquaculture* *472*, 81–92. 10.1016/j.aquaculture.2016.03.005.
40. Raschdorf, A., Sünderhauf, A., Skibbe, K., Ghebrehiwet, B., Peerschke, E.I., Sina, C., and Derer, S. (2021). Heterozygous P32/C1QBP/HABP1 Polymorphism rs56014026 Reduces Mitochondrial Oxidative Phosphorylation and Is Expressed in Low-grade Colorectal Carcinomas. *Frontiers in Oncology* *10*.
41. Kirchner, P., Bourdenx, M., Madrigal-Matute, J., Tiano, S., Diaz, A., Bartholdy, B.A., Will, B., and Cuervo, A.M. (2019). Proteome-wide analysis of chaperone-mediated autophagy targeting motifs. *PLoS Biol.* *17*, e3000301. 10.1371/journal.pbio.3000301.
42. Velez, E.J., Schnebert, S., Goguet, M., Balbuena-Pecino, S., Dias, K., Beauclair, L., Fontagné-Dicharry, S., Véron, V., Depincé, A., Beaumatin, F., et al. Chaperone-Mediated Autophagy Protects Against Hyperglycemic Stress. *Autophagy*.
43. Asaoka, Y., Terai, S., Sakaida, I., and Nishina, H. (2013). The expanding role of fish models in understanding non-alcoholic fatty liver disease. *Dis Model Mech* *6*, 905–914. 10.1242/dmm.011981.
44. Hayashi, Y., and Matsui, Y. (2023). Metabolic Control of Germline Formation and Differentiation in Mammals. *Sexual Development* *16*, 388–403. 10.1159/000520662.
45. Costa, J., Braga, P.C., Rebelo, I., Oliveira, P.F., and Alves, M.G. (2023). Mitochondria Quality Control and Male Fertility. *Biology* *12*, 827. 10.3390/biology12060827.

46. Barbagallo, F., La Vignera, S., Cannarella, R., Aversa, A., Calogero, A.E., and Condorelli, R.A. (2020). Evaluation of Sperm Mitochondrial Function: A Key Organelle for Sperm Motility. *Journal of Clinical Medicine* 9, 363. 10.3390/jcm9020363.
47. Koppers, A.J., De Iuliis, G.N., Finnie, J.M., McLaughlin, E.A., and Aitken, R.J. (2008). Significance of Mitochondrial Reactive Oxygen Species in the Generation of Oxidative Stress in Spermatozoa. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 93, 3199–3207. 10.1210/jc.2007-2616.
48. Wang, X., Sharma, R.K., Gupta, A., George, V., Thomas, A.J., Falcone, T., and Agarwal, A. (2003). Alterations in mitochondria membrane potential and oxidative stress in infertile men: a prospective observational study. *Fertility and Sterility* 80, 844–850. 10.1016/S0015-0282(03)00983-X.
49. The role of mitochondria in energy production for human sperm motility - Piomboni - 2012 - *International Journal of Andrology* - Wiley Online Library <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2605.2011.01218.x>.
50. Durairajanayagam, D., Singh, D., Agarwal, A., and Henkel, R. (2021). Causes and consequences of sperm mitochondrial dysfunction. *Andrologia* 53, e13666. 10.1111/and.13666.
51. Yang, R., Gao, G., Mao, Z., and Yang, Q. (2016). Chaperone-Mediated Autophagy and Mitochondrial Homeostasis in Parkinson's Disease. *Parkinsons Dis* 2016, 2613401. 10.1155/2016/2613401.
52. Wang, B., Cai, Z., Tao, K., Zeng, W., Lu, F., Yang, R., Feng, D., Gao, G., and Yang, Q. (2016). Essential control of mitochondrial morphology and function by chaperone-mediated autophagy through degradation of PARK7. *Autophagy* 12, 1215–1228. 10.1080/15548627.2016.1179401.
53. Nie, T., Tao, K., Zhu, L., Huang, L., Hu, S., Yang, R., Xu, P., Mao, Z., and Yang, Q. (2021). Chaperone-mediated autophagy controls the turnover of E3 ubiquitin ligase MARCHF5 and regulates mitochondrial dynamics. *Autophagy* 17, 2923–2938. 10.1080/15548627.2020.1848128.
54. Gallego, V., Carneiro, P.C.F., Mazzeo, I., Vílchez, M.C., Peñaranda, D.S., Soler, C., Pérez, L., and Asturiano, J.F. (2013). Standardization of European eel (*Anguilla anguilla*) sperm motility evaluation by CASA software. *Theriogenology* 79, 1034–1040. 10.1016/j.theriogenology.2013.01.019.
55. Chen, E.Y., Tan, C.M., Kou, Y., Duan, Q., Wang, Z., Meirelles, G.V., Clark, N.R., and Ma'ayan, A. (2013). Enrichr: interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool. *BMC Bioinformatics* 14, 128. 10.1186/1471-2105-14-128.
56. Kuleshov, M.V., Jones, M.R., Rouillard, A.D., Fernandez, N.F., Duan, Q., Wang, Z., Koplev, S., Jenkins, S.L., Jagodnik, K.M., Lachmann, A., et al. (2016). Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. *Nucleic Acids Res* 44, W90-97. 10.1093/nar/gkw377.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Zebrafish primary embryonic cells display a functional CMA process. (A) Experimental Setup. Microinjection of KFERQ-Dendra2-coding mRNAs into zebrafish embryos at fertilization. Cells from 50% epiboly embryos were isolated and photoactivated with a 405 nm LED for 10 minutes. Cells were then subjected to various conditions: untreated (Serum+), mild oxidative stress (H₂O₂, 25 μ M), and/or serum deprivation (Serum-) for 16 hours. CMA activity was quantified by counting KFERQ-Dendra2 puncta. (B) Representative images of zebrafish primary embryonic cells visualized by super-resolution fluorescence microscopy (scale bar, 10 μ m). Nuclei were stained with Hoechst 33342 (blue). Under serum-rich conditions (Serum+), the reporter diffusely localized in the cytoplasm with few puncta (B1 to B3). In serum-deprived and/or H₂O₂-treated conditions, punctate patterns were observed. (B4 to B12). (C) Quantification of KFERQ-Dendra2 reporter puncta per cell (n=50 cells/condition). Averages (horizontal lines) obtained with cells cultured without serum (Serum-) and/or with H₂O₂ were compared with those of control cells (Serum+) using a Student t-test (***, p<0.001). (D) Representative images of zebrafish primary embryonic cells microinjected with KFERQ-Dendra2 (red) and LAMP1-GFP (green). Under Serum+ condition, the CMA reporter is diffusely localized throughout the cytoplasm (D1) and no co-localization with LAMP1-GFP is observed (D4 and D5). However, upon serum deprivation and H₂O₂ treatment, most of the KFERQ-PA-mCherry1 puncta (D6) co-localized with the green lysosomal marker LAMP1-GFP (D7), as indicated by the arrowheads (D9) and amplified in the insets (D10). (E) Quantification of percentage of co-localization of CMA reporter puncta with LAMP1-GFP per cell under Serum+ and Serum-/H₂O₂ conditions (n=50 cells/condition). A Student t-test was performed to compare both conditions (***, p<0.001). (F) Representative images of zebrafish primary embryonic cells micro-injected with mRNAs coding for either the CMA reporter KFERQ-Dendra2 (KFERQ+) (F1 and F4), the PA-Dendra2 construct lacking the KFERQ motif (KFERQ-) (F2 and F5), or a mutant reporter with a non-functional KFEAA-sequence (KFEAA) (F3 and F6). After photoactivation, cells were cultivated in Serum+ (F1 to F3) or Serum-/H₂O₂ (F4 to F6) conditions. Nuclei were stained with Hoechst 33342 (blue). (G) Quantification of the number of puncta obtained with each construction and under each condition described in F. All values correspond to individual images (n=50 cells/condition). The lines represent the average for each condition. For each construction, the Serum+ condition was compared to the Serum-/H₂O₂ condition with a t-test (***, p<0.001). (H) Representative

images of zebrafish primary embryonic cells micro-injected with mRNAs coding for the KFERQ-Dendra2 reporter without (H1) or with (H2) splice-blocking morpholino antisense oligos against zebrafish lamp2a. Cells were maintained in the presence or absence of serum for 16 h. Nuclei were stained with Hoechst 33342. (I) Quantification of KFERQ-Dendra2 reporter red puncta per cell. After 16 h starvation, specific knockdown of lamp2a results in significant losses of KFERQ-reporter puncta compared to the 16 h starved control group. All values correspond to individual images (n=50 cells/condition). The lines represent the average for each condition. The two conditions were compared with a Student t-test ($p < 0.001^{***}$). (J) Representative images of zebrafish primary embryonic cells micro-injected with both mRNAs coding for the KFERQ-Dendra2 reporter and morpholino antisense oligos against the translational start site of atg7. After photoactivation, cells were maintained in the presence (Serum +) or absence of serum (Serum-) for 16 h. Nuclei were stained with Hoechst 33342. (K) Quantification of KFERQ-Dendra2 reporter red puncta per cell. All values correspond to individual images (n=50 cells/condition). The lines represent the average for each condition. The two conditions were compared with a t-test ($p < 0.001^{***}$). (L) Representative images of zebrafish primary embryonic cells micro-injected with mRNAs coding for the KFERQ-Dendra2 reporter and maintained in the absence of serum (Serum-) for 16 h and 40h. (M) Quantification of KFERQ-Dendra2 reporter red puncta per cell. All values correspond to individual images (n=50 cells/condition). The lines represent the average for each condition. The two conditions were compared with a t-test ($p < 0.001^{***}$). (N) Representative images of zebrafish primary embryonic cells micro-injected with mRNAs coding for the KFERQ-Dendra2 reporter and maintained in a serum-rich medium (Serum+), serum-free medium (Serum-) or serum-free medium containing a lysosomal protease inhibitor (Serum- / PI). (O) Quantification of KFERQ-Dendra2 reporter red puncta per cell. All values correspond to individual images (n=50 cells/condition). The lines represent the average for each condition. The different conditions were compared with a t-test ($p < 0.001^{***}$).

Figure 2. Monitoring CMA activity at cellular resolution using the zebrafish KFERQ-Dendra2 line. (A) Left: Map of the vector used for generation of the KFERQ-PS-Dendra2 transgenic zebrafish line. Right: Experimental Setup. (B) Zebrafish KFERQ-Dendra2 line were exposed (Photoswitch+; PS+) or not (Photoswitch-; PS-) to a 405nm light for 10 min, and photoswitching was monitored by imaging fish in the green (B1 and B3) and red (B2 and B4) channels. Following exposure to 405 nm light, KFERQ-Dendra2 fish emit red fluorescence in

all tissues examined (B5-B8). B5: eye in lateral view; B6: head in ventral view; B7: trunk in lateral view; B8: tail in lateral view. (C) RT-qPCR for lamp2a in the indicated tissues relative to 18S RNA in starved conditions, n=3 fish. (D) Brightfield (D1) and green fluorescence (D2) imaging of kidney sections from KFERQ-Dendra2 zebrafish starved for 48 hours. Green Dendra positive puncta (arrows) are shown. Asterisk shows the collecting duct. (E) Representative images of kidney tubules from fed (E1) or 48 h starved (E3) KFERQ-Dendra2 zebrafish. E2 and E4 show boxed areas at higher magnification. E5 shows a 3D representation of a tubule from KFERQ-Dendra2 zebrafish starved for 48 hours. (F) Dendra-positive puncta quantification from 4 kidneys per line from 4 independent experiments. (G) Red KFERQ-Dendra2 fluorescence (G1) and Hoechst nuclear staining (G2) in kidney tubules from 48 h starved KFERQ-Dendra2 zebrafish. (H) Red fluorescence (H1) and LysoTracker staining (H2) of kidneys from 48 h starved KFERQ-Dendra2 zebrafish reveal clear co-localization of the two signals (arrows in H3), confirming the lysosomal localization of the reporter. (I) KFERQ-Dendra2 red fluorescence in kidney from fed (I1) or starved for 48 h (I3) KFERQ-Dendra2-L2A-KO zebrafish. I2 and I4 show boxed areas at higher magnification. (J) Red KFERQ-Dendra2 fluorescence (J1) and Hoechst nuclear staining (J2) in kidney tubules from 48 h starved KFERQ-Dendra2-L2A-KO zebrafish. (J3) Red fluorescence and (J4) LysoTracker staining of kidneys from 48 h starved KFERQ-Dendra2-L2A-KO zebrafish reveal no co-localization of the two signals.

Figure 3. CMA activity in testes. (A) Red KFERQ-Dendra2 fluorescence (A1 and A4) and Hoechst nuclear staining (A2 and A5) in testes from fed (A1 and A2) and 48 h starved (A4 and A5) KFERQ-Dendra2 zebrafish. A3 and A6 show boxed areas at higher magnification. A7, Dendra-positive puncta quantification from 4 testes per line from 4 independent experiments. (B) Red KFERQ-mCherry fluorescence (B1) and green GSDF-GFP + Red KFERQ-mCherry fluorescence (B2) in testis from a GSDF-GFP+ KFERQ-mCherry zebrafish transgenic line. B3 and B4 show boxed areas at higher magnification. Red KFERQ-mCherry positive puncta (arrows) are shown.

Figure 4. CMA controls the production of active spermatozoa. (A) Testes from WT (A1-A4) and Lamp2A-KO (A5-A8) zebrafish were stained with H&E. A2-A8 show boxed areas at higher magnification. (B) Quantification of the number of nuclei in each size category. For each size category the different lines (WT vs Lamp2a-KO) were compared with a t-test ($p < 0.05^*$).

(C) Heatmap of RNA-seq data depicting differences in expression levels of selected genes between Lamp2a-KO and WT zebrafish. Four independent samples for each line were used for RNA-seq experiment. (D) Representative images from videos of semen samples from WT (D1) and Lamp2AKO (D2) zebrafish analyzed with CASA. Blue tracks = rapid-swimming sperm, green tracks = medium-swimming sperm, pink tracks = spermatozoa spinning on themselves, red tracks = static sperm. D3, Percentage of motile sperm cells from WT and L2AKO zebrafish. Each reported value corresponds to one fish (for a total of n=8-9 fish per line, corresponding to a final number of 3200-3600 spermatozoa analyzed per line). The horizontal lines represent the average for each condition. The different conditions were compared with a t-test ($p < 0.001$ ***). (E) Analysis of sperm motility parameters in WT and L2AKO zebrafish. E1, Detailed kinematics measured for each sperm cell. Curvilinear velocity (VCL) is the distance over time of the actual path of the sperm head, whereas path velocity (VAP) is the distance along a 5 point mathematically smoothed path that the sperm travels over time. The third velocity measurement “straight line velocity” (VSL) is the straight line distance between the position of the sperm head in the first frame of analysis and the position of that sperm head in the last frame of analysis over the fixed time of analysis. E2-E3, Each reported value corresponds to one fish (for a total of n=8-9 fish per line, corresponding to a final number of 3200-3600 spermatozoa analyzed per line). The horizontal lines represent the average for each condition. The different conditions were compared with a t-test ($p < 0.001$ ***).

Figure 5. Deletion of Lamp2a in zebrafish leads to substantial remodeling of the sperm proteome and to defects in mitochondrial functions. (A) Volcano plot of the quantitative proteomics analysis of spermatozoa L2A-KO VS WT. Top left: number of identified proteins (n) and significantly down-regulated hits. Top right: number of significantly up-regulated hits. Green and red dots indicate significantly down- and up-regulated proteins, respectively ($p < 0.05$ and fold change > 1.3). (B) Gene ontology analysis of proteins down-regulated upon Lamp2a blockage. (C) Gene ontology analysis of proteins up-regulated upon Lamp2a blockage. (D) Schematic illustration depicting JC-1 entry into the mitochondria and the generation of J aggregate. JC-1, a cationic carbocyanine dye (green) exhibits potential dependent accumulation in mitochondria where it starts forming J aggregates (red); upon depolarization, it remains as monomer showing green fluorescence. The change in ratio of red to green fluorescence is used as an indicator of mitochondrial condition. (E) Representative flow cytometry analysis of JC-1 staining in sperm cells from WT (D1) and L2AKO (D2) zebrafish. Horizontal (green) axis and

Vertical (red) axis represent fluorescence intensities of JC-1 monomers and JC-1 aggregates, respectively. Increased intensity of monomers indicates decreased MMP. (F) Ratio of JC-1 monomers and aggregates is presented as the Mean \pm SD of 3 independent experiments. Ratios were significantly decreased in L2AKO sperm cells compared to their WT counterparts. * $p < 0.05$, tested by Student t-test.

Figure S1. Generation of Lamp2a-Ko zebrafish using Crispr-cas9 method. (A) Schematic representation of the strategy used to generate the specific lamp2a knockout zebrafish. (B) Genotyping of lamp2a allele was performed by PCR of fin from fish generated by Crispr-cas9 method. Mutant fish (-/-) displayed a deletion of the 737bp (low band) compared to wild type (+/+) fish (high band). Heterozygous fish (+/-) are shown as an additional control. (C) Sequence alignment of the gene *lamp2* between wild type and mutant zebrafish showing the deletion in Ko fish of the 737bp region in exon 6 (in green) that encodes for the specific cytosolic and transmembrane domains of the Lamp2a protein. (D) lamp2a, b and c transcripts levels obtained by RT-qPCR in whole fish, testis, gut and kidney of wild type and Lamp2a-Ko zebrafish. Data are means \pm SD. The data were normalized by the values of 18S. A Student t-test was performed ($p < 0.05$). ns, not significant.

Figure S2. Atg12–Atg5 autophagy complex formation after anti-atg7 morpholino (MO) injection. Embryos were injected at the 1-cell stage with control or anti-atg7 MOs, and lysates were prepared for immunoblot analysis at 16 hpf. (A) Immunoblot with anti-Atg5 antibody. No-Stain™ total protein labeling is shown as a loading control. (B) Densitometric analysis. Data are expressed relative to control (WT) zebrafish (n=1 pool of 50-60 embryos/condition).

Figure S3. (A) RT-qPCR for Dendra in the indicated tissues relative to the average of 18S in in wild type and Lamp2a-Ko fed and starved zebrafish. Data are means \pm SD. A Student t-test was performed ($p < 0.05$). ns, not significant. (B) Video showing all the z-stack images acquired from representative tubules of KFERQ-Dendra2 WT (left) and KFERQ-Dendra2 -L2A-KO (right) zebrafish.

Figure S4. (A) Expression of the gene *LAMP2* (from single nucleus RNA profiling) along spermatogenesis for human, mouse, opossum, and chicken. Exact binomial tests were performed for statistical comparisons (**** $P < 0.0001$). OS, Other somatic; ST, Sertoli; SG,

Spermatogonia; SC, Spermatocytes; rSD, Round spermatids; eSD, Elongated spermatids. (B) Video of sperm from WT and Lamp2a-KO zebrafish analyzed with CASA. Blue tracks = rapid-swimming sperm, green tracks = medium-swimming sperm, pink tracks = spermatozoa spinning on themselves, red tracks = static sperm.

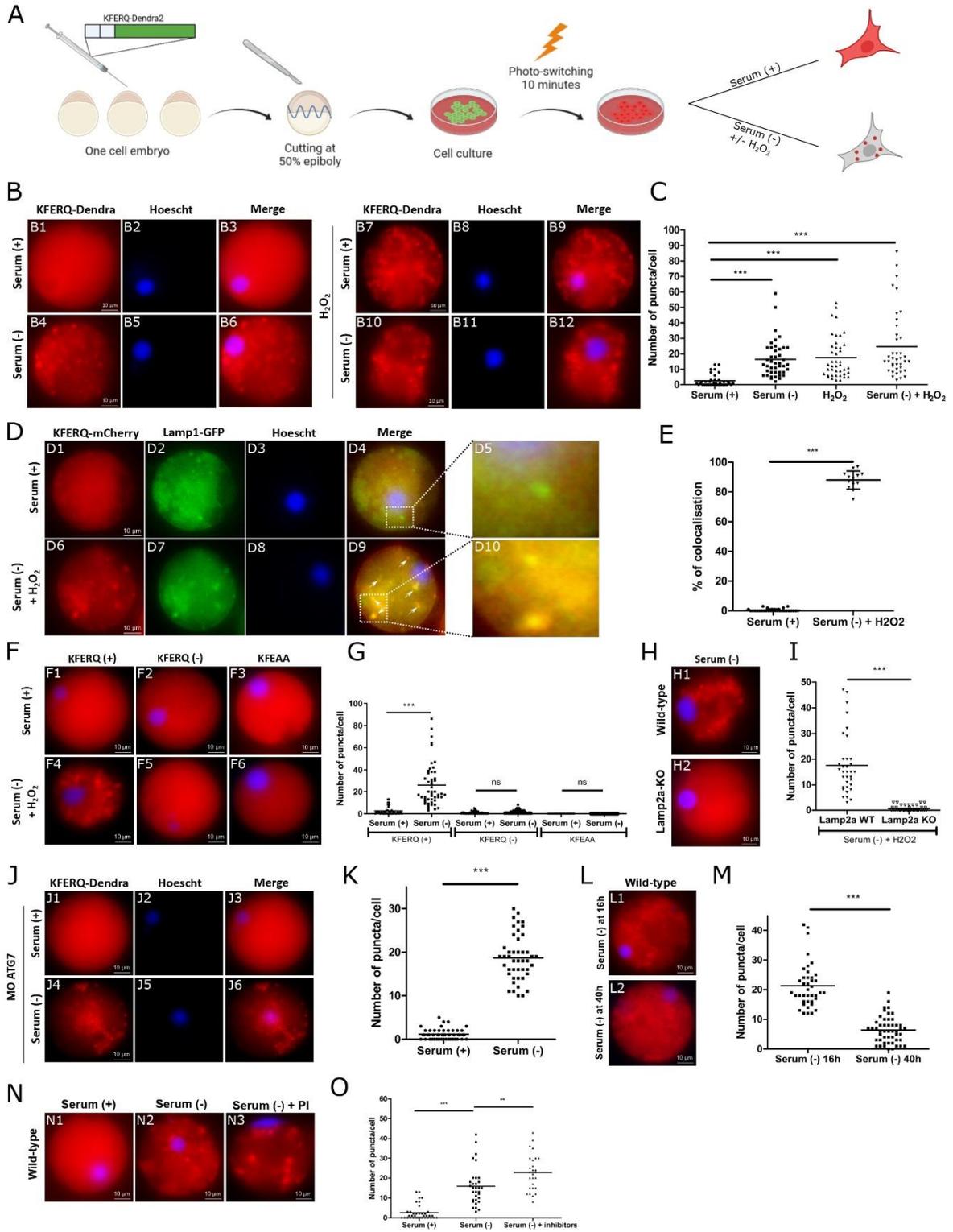


Figure 1

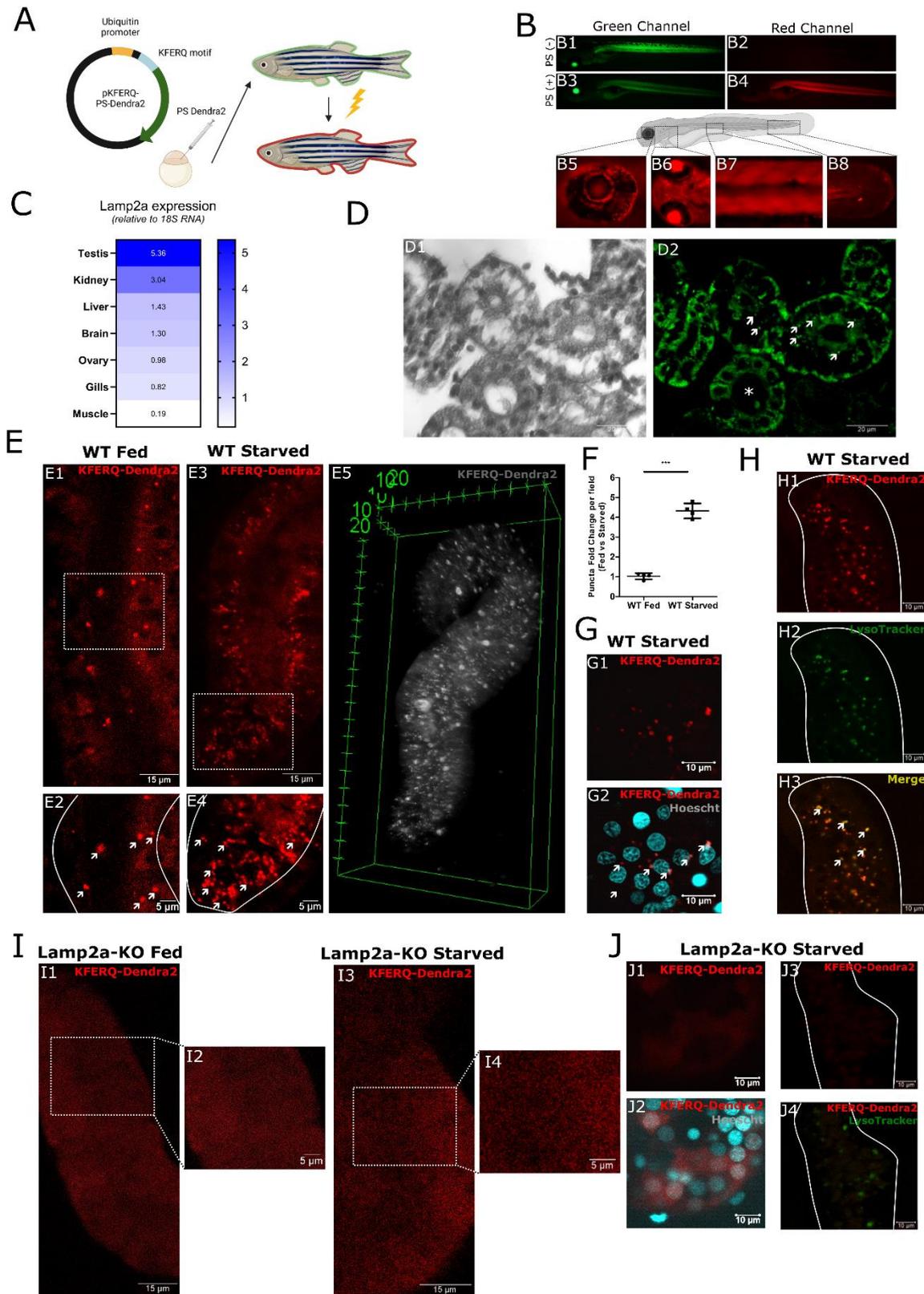


Figure 2

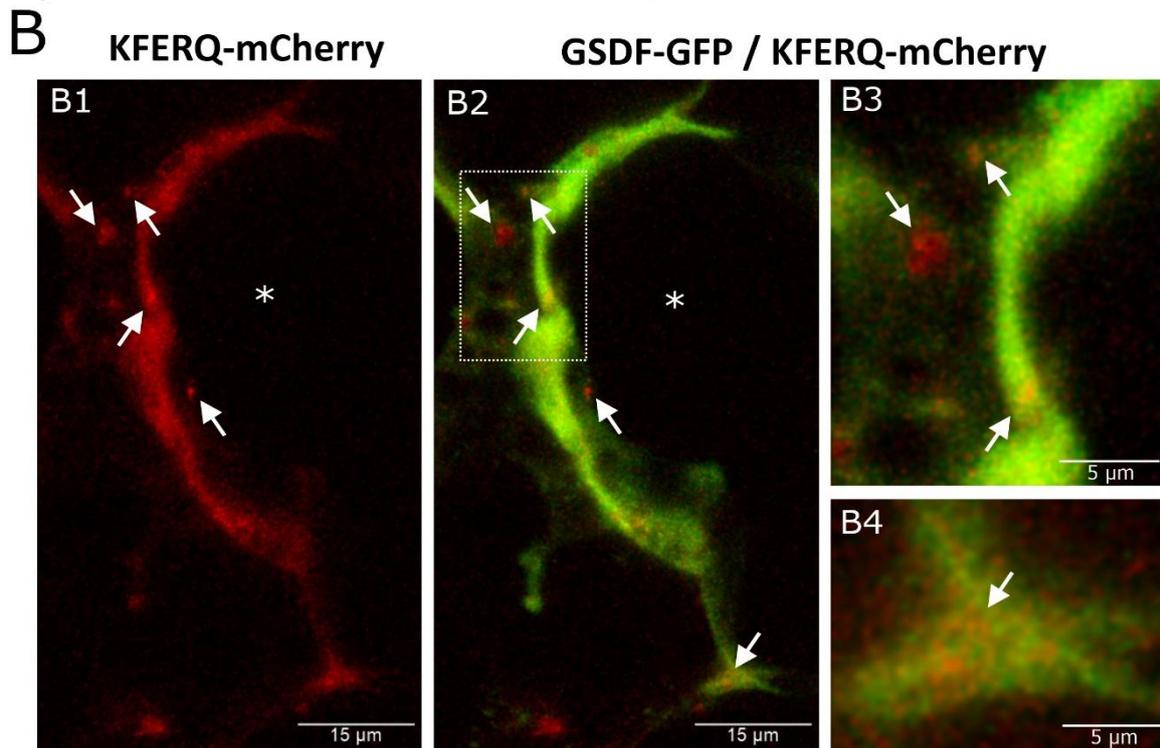
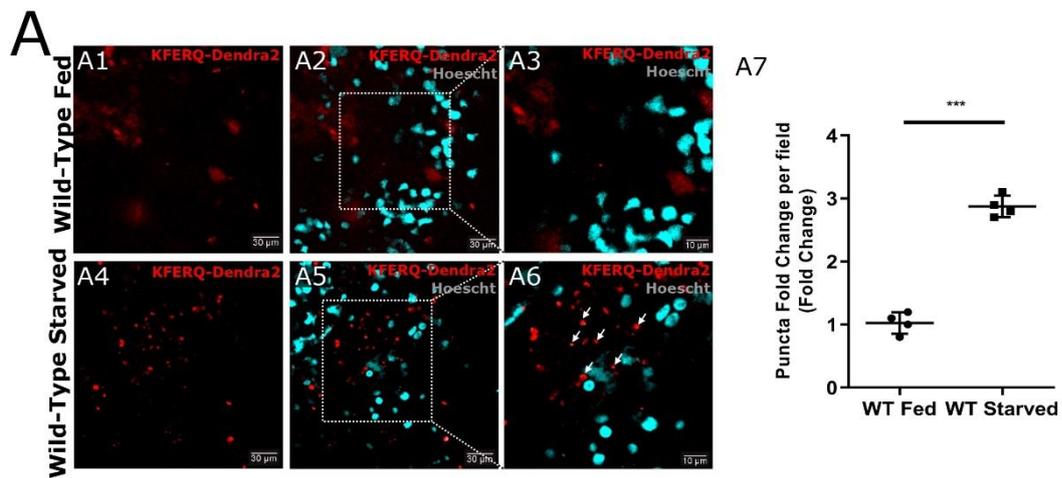


Figure 3

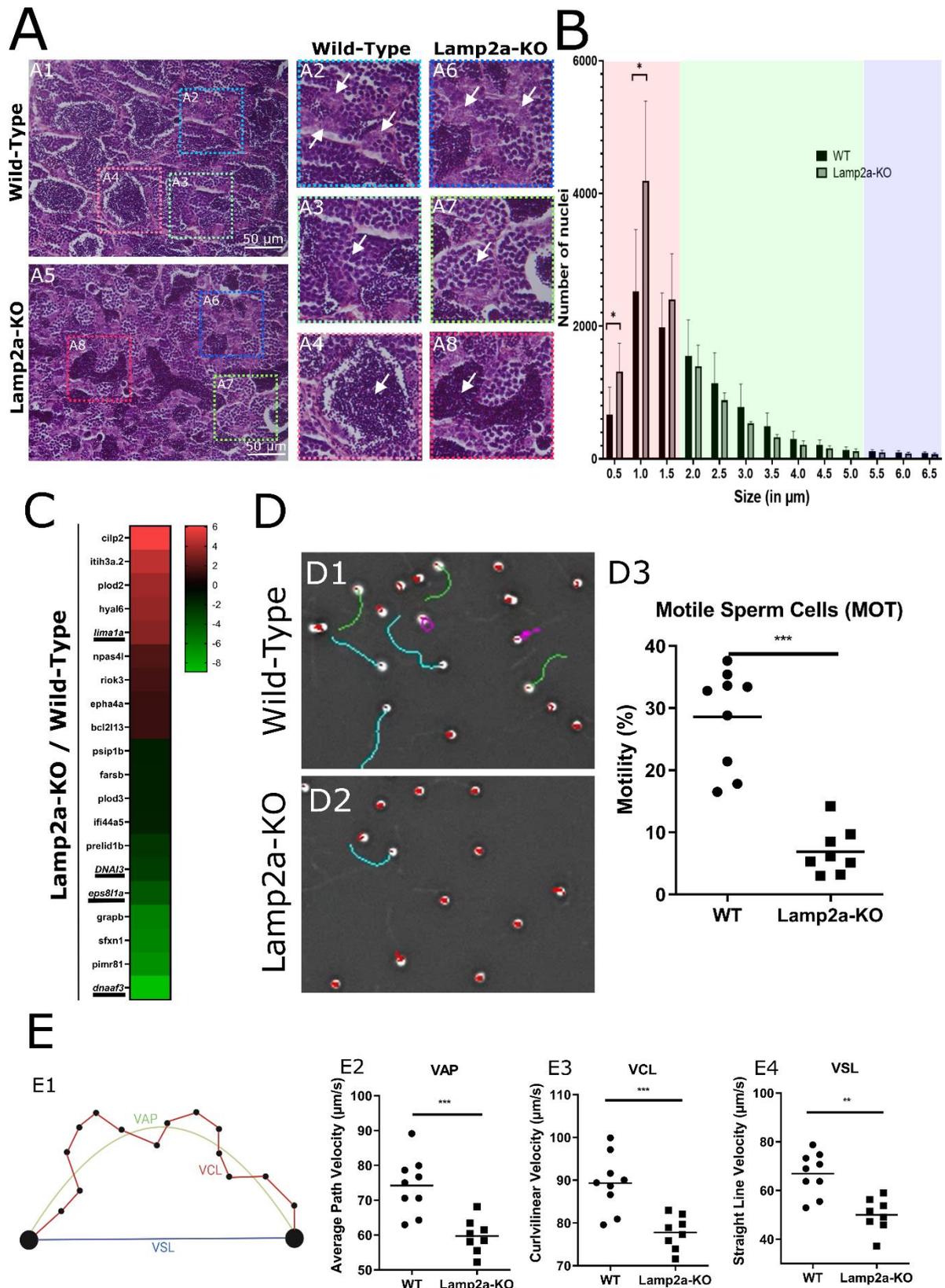


Figure 4

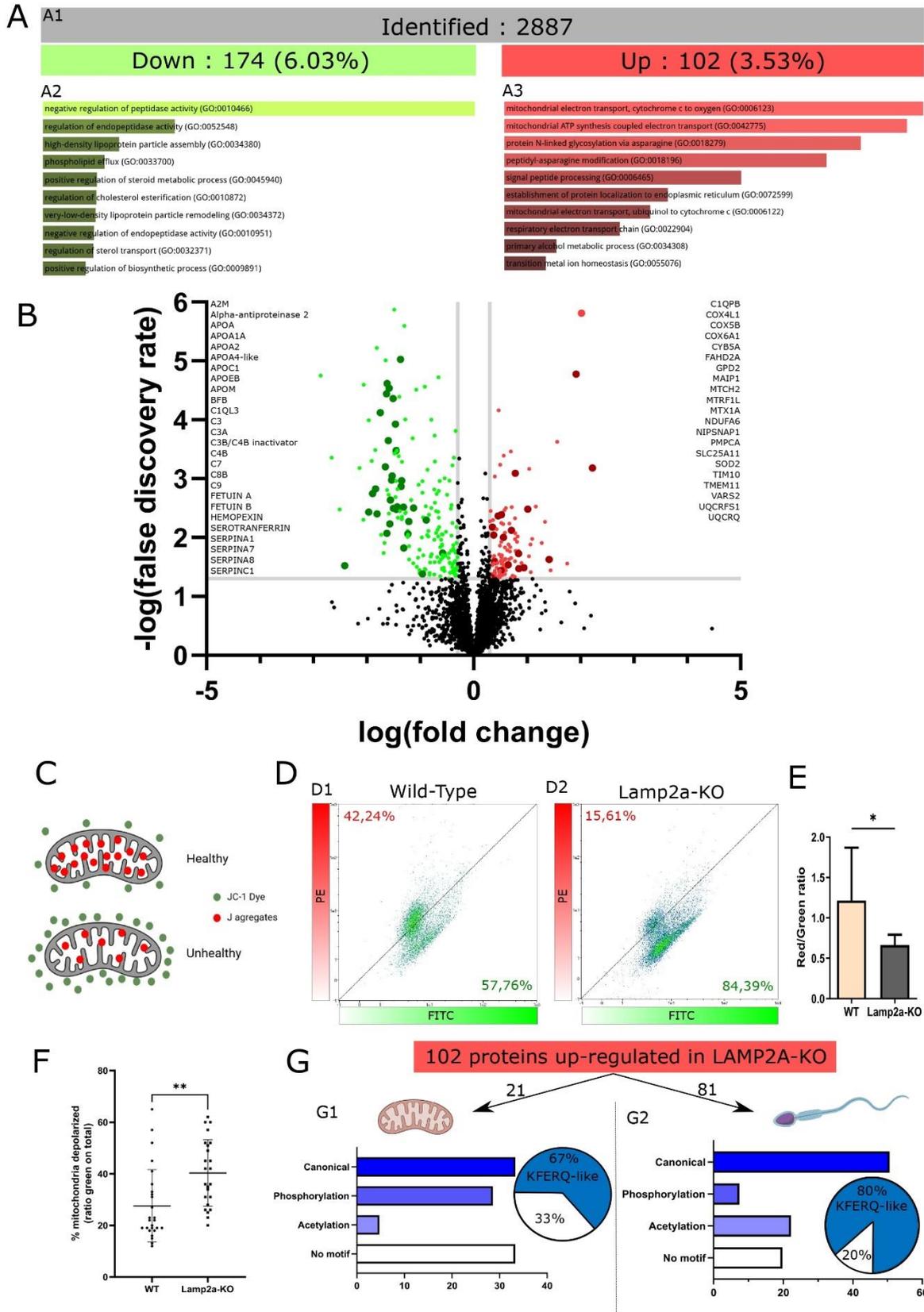


Figure 5

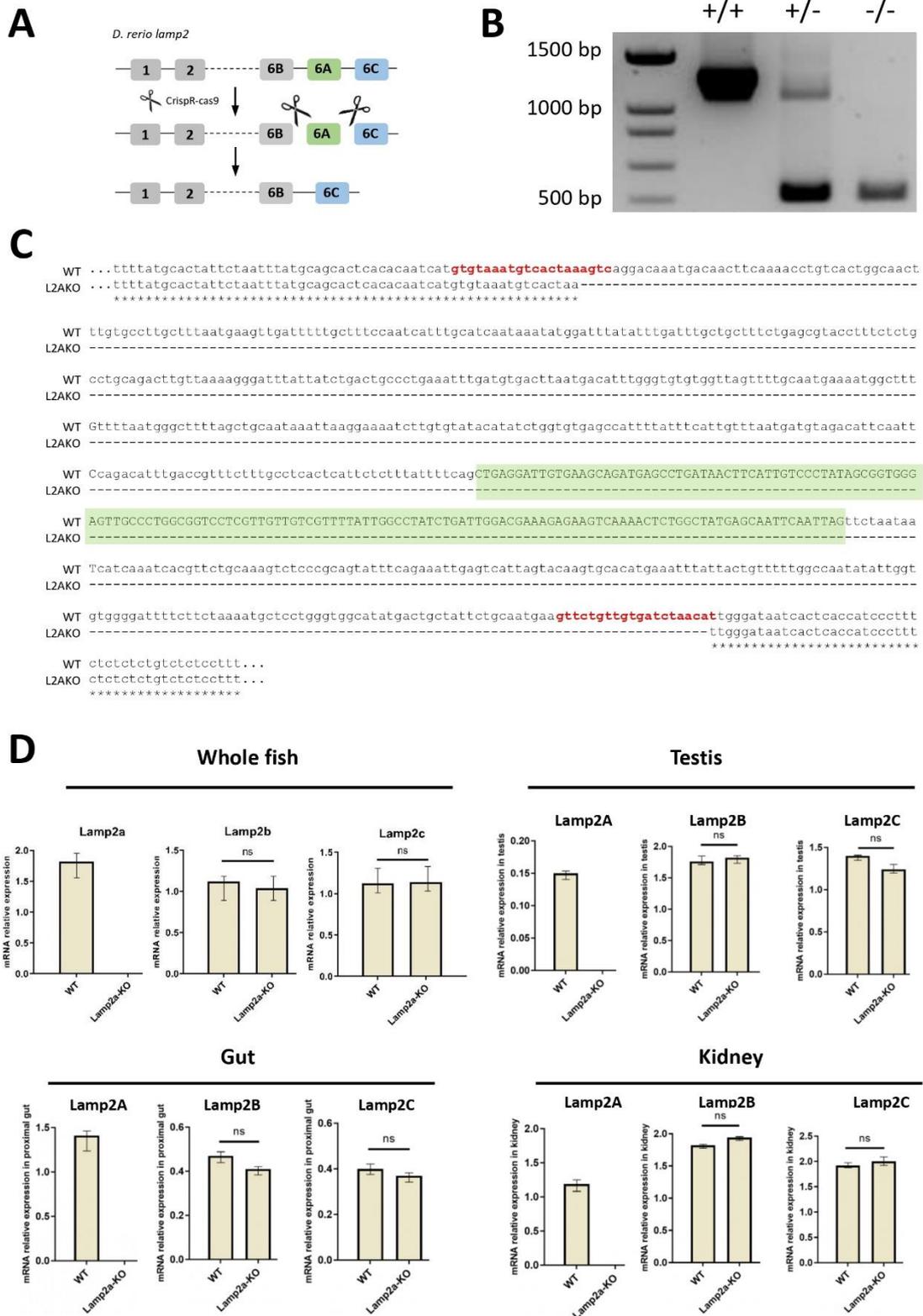


Figure S1

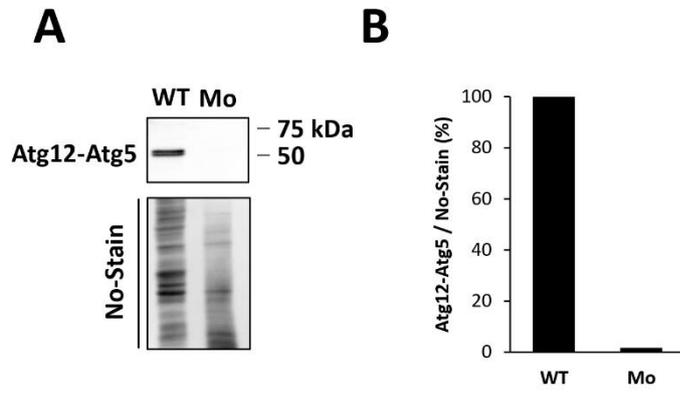
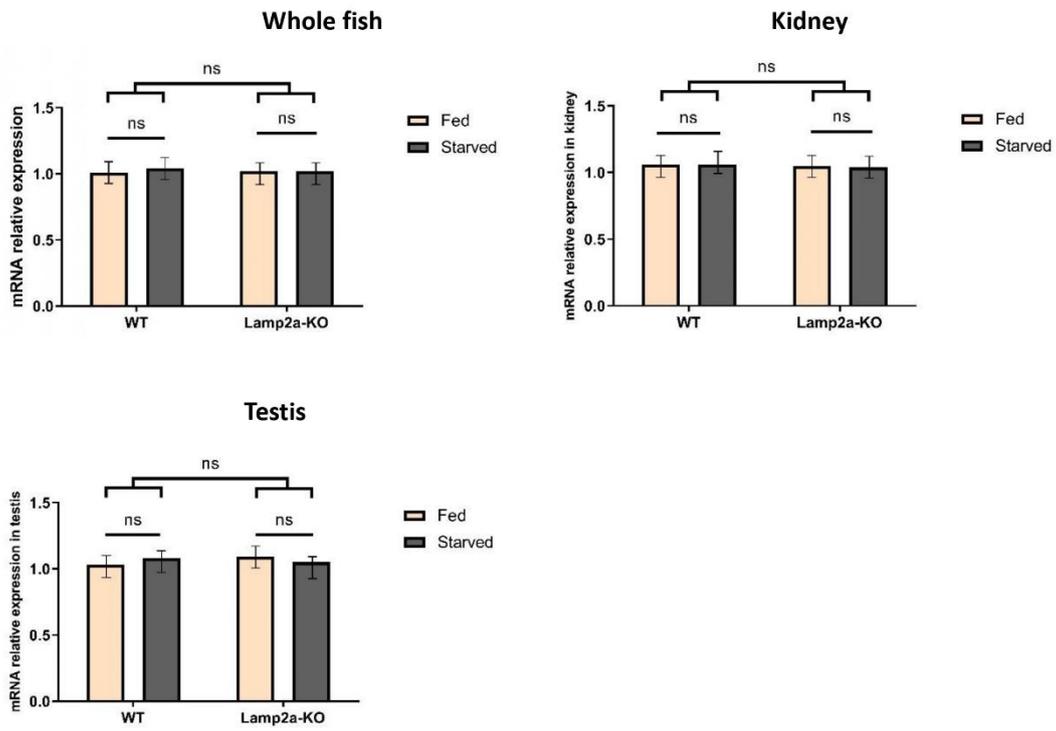
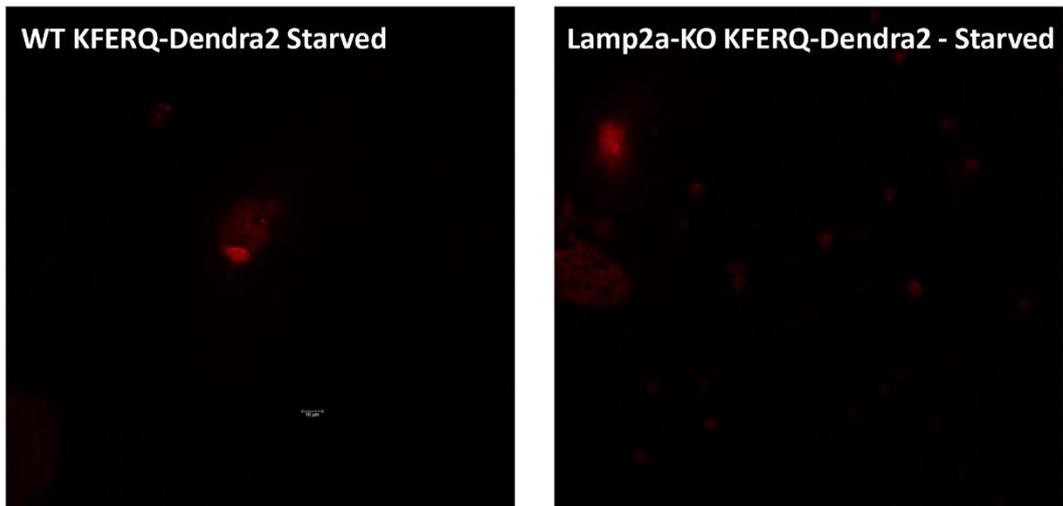


Figure S2

A**B****Figure S3**

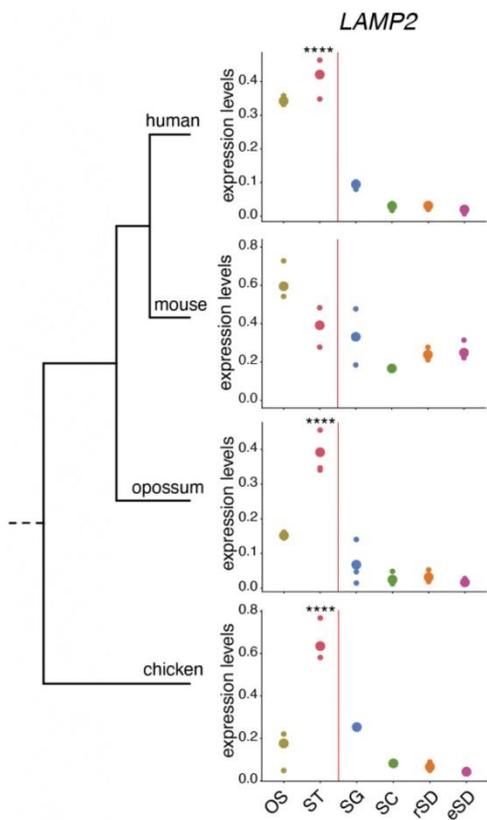
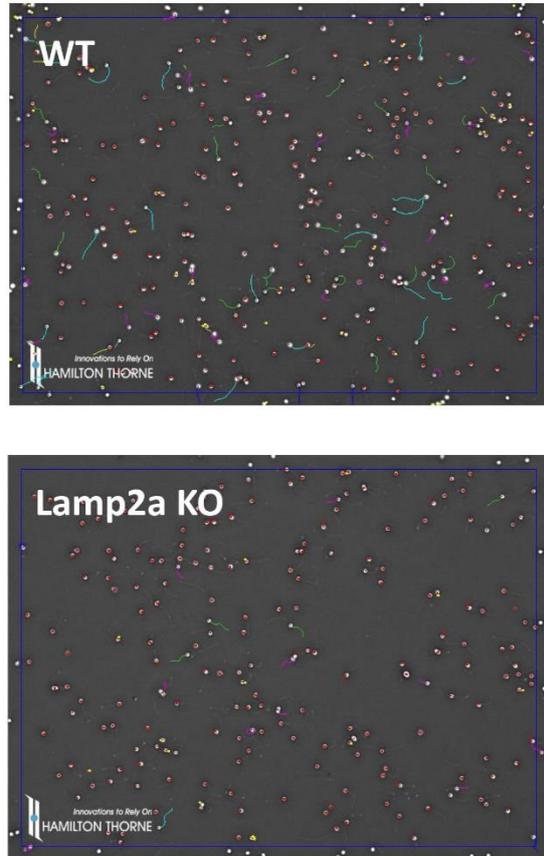
A**B****Figure S4**

Table S1: Comparative transcriptomic of testes between Lamp2A-KO and WT

	Ensembl	Gene name	Log2_fc	Log10_pval
DOWN	ENSDARG00000006588	zgc:111983	-7.057	0,0058963712615
	ENSDARG00000012642	znf271	-2.558	0,0061126475785
	ENSDARG00000013161	zgc:55558	-2.029	0,0000000000000
	ENSDARG00000014914	lamp2	-1.404	0,0029168438961
	ENSDARG00000016864	farsb	-1.497	0,0014956395368
	ENSDARG00000019963	sfxn1	-6.191	0,0252439699716
	ENSDARG00000022372	kng1	-2.417	0,0031277017010
	ENSDARG00000022668	grapb	-5.91	0,0002077372478
	ENSDARG00000030250	dennd2db	-1.775	0,0499676643027
	ENSDARG00000038987	si:dkey-31m5.5	-4.514	0,0476562314766
	ENSDARG00000044169	prelid1b	-2.578	0,0004361304046
	ENSDARG00000057984	eps8l1a	-4.178	0,0000000589019
	ENSDARG00000068916	ppp1r35	-2.014	0,0151400968999
	ENSDARG00000074379	knstrn	-1.105	0,0003203290567
	ENSDARG00000076317	plod3	-1.571	0,0000000461009
	ENSDARG00000076443	si:dkey-183c6.8	-1.45	0,0310061704219
	ENSDARG00000077405	psip1b	-1.425	0,0001410283950
	ENSDARG00000077567	angel1	-1.122	0,0107276853540
	ENSDARG00000092361	ifi44a5	-1.583	0,0039528390045
	ENSDARG00000092662	dnaaf3	-8.932	0,0000000000000
	ENSDARG00000096792	si:dkey-66i24.10	-2.837	0,0326116787760
	ENSDARG00000099446	slit1b	-2.47	0,0115488033203
	ENSDARG00000099695	si:dkey-61n16.5	-3.549	0,0061126475785
	ENSDARG00000101986	irf6	-1.137	0,0011874779048
	ENSDARG00000104914	muc5f	-7.152	0,0199187300497
	ENSDARG00000105093	DNAI3	-2.864	0,0000001901639
	ENSDARG00000110627	zgc:171310	-2.208	0,0135243448050
	ENSDARG00000116558	pimr81	-6.742	0,0107276853540
	ENSDARG00000116713	si:ch73-265d7.2	-1.358	0,0000003550869
	ENSDARG00000117535	AL929493.2	-6.716	0,0496673895016
ENSDARG00000117590	CR385067.1	-1.152	0,0128942974436	
UP	ENSDARG00000009624	uts2r1	6.066	0,0163784235661
	ENSDARG00000011821	plod2	3.849	0,0128625872770
	ENSDARG00000013687	cilp2	6.089	0,0300376587550
	ENSDARG00000038166	hyal6	3.615	0,0061126475785
	ENSDARG00000042751	riok3	1.648	0,0044886519526
	ENSDARG00000054454	epha4a	1.385	0,0240956583383
	ENSDARG00000055053	itih3a.2	4.603	0,0151400968999
	ENSDARG00000055838	mettl16	1.094	0,0431198621212
	ENSDARG00000057328	cth1	2.551	0,0497036223391
	ENSDARG00000061714	si:dkey-45k15.1	6.571	0,0176722022667
	ENSDARG00000062370	bcl2l13	1.383	0,0310061704219
	ENSDARG00000067673	snapc4	1.118	0,0235073810559
	ENSDARG00000070526	zc2hc1c	1.084	0,0176722022667
	ENSDARG00000077571	zgc:174862	7.836	0,0000009503724
	ENSDARG00000086859	qdprrb.2	2.745	0,0127578350988
	ENSDARG00000090071	rxfp1	2.299	0,0412321708622
	ENSDARG00000095940	si:dkey-19a16.12	5.294	0,0188458266415
	ENSDARG00000096447	si:dkey-19l18.10	6.055	0,0473942654603
	ENSDARG00000097826	si:dkey-239b22.2	4.465	0,0127578350988
	ENSDARG00000099023	slamf9	6.653	0,0252439699716
	ENSDARG00000101441	lima1a	3.255	0,0000003550869
	ENSDARG00000104450	atp8b5b	5.403	0,0490513094309
	ENSDARG00000109284	BX890568	4.575	0,0004674468964
	ENSDARG00000113893	si:dkey-30g5.1	6.616	0,0025369637682
	ENSDARG00000116005	zgc:171446	3.547	0,0227184639540
	ENSDARG00000116511	npas4l	1.943	0,0473942654603

Table S1

Table S2: Quantitative proteomic analysis of sperm from downregulated proteins

	Entry Name	Gene	log2_fc	log10_pval	Entry Name	Gene	log2_fc	log10_pval	
DOWN	A0A8M1PCL5_DANRE	rad9a	-0,611576547	1,627277326	CRP_DANRE	crp	-2,507805458	2,475607772	
	A0A8M1PEJ5_DANRE	scinlb	-0,66163355	2,017709238	E7FCQ0_DANRE	cnbp	-0,800986909	1,676603339	
	A0A8M1PG22_DANRE	plg	-1,841571795	3,487072257	E7FE90_DANRE	fetub	-1,745501116	4,124694803	
	A0A8M1PNS3_DANRE	b2ml	-0,554422687	1,690705421	E9QD1_DANRE	apoc1	-1,572110909	2,233114852	
	A0A8M1Q134_DANRE	si:ch211-270n8.1	-1,297012467	5,597370553	F1QF69_DANRE	soul5	-1,076468259	4,51325502	
	A0A8M1QLM0_DANRE	LOC795897	-2,136286349	3,180298319	F1QFC2_DANRE	cfb	-1,629853696	4,443218466	
	A0A8M1QLT2_DANRE	LOC100006895	-1,509038133	4,363686489	F1QJD1_DANRE	apoa4b.2	-1,448383087	2,476141323	
	A0A8M1RJW9_DANRE	adgr1.1	-1,207767571	1,626072899	F1QNF2_DANRE	cbx3a	-0,331240496	1,475593018	
	A0A8M1RP53_DANRE	gsdf	-0,899708112	2,531993921	F1QPG5_DANRE	ubtd2	-0,357275826	1,772182135	
	A0A8M2B6L5_DANRE	si:ch211-13c6.2	-0,791179261	4,002891678	F1QQK5_DANRE	nudt22	-1,342773953	3,288644056	
	A0A8M2B7F9_DANRE	cep135	-0,442948799	1,402356485	HEMO_DANRE	hpx	-1,478705125	3,42900325	
	A0A8M2BCI9_DANRE	dph7	-0,598517745	2,058070266	L3BPB_DANRE	lgals3bpb	-0,905433388	1,455495384	
	A0A8M2BG95_DANRE	f2	-1,729046245	2,047487784	LEG1A_DANRE	leg1a	-1,23866656	2,014152526	
	A0A8M2BGJ6_DANRE	ipo9	-0,439622655	1,562591676	LEG1B_DANRE	leg1b	-1,278444933	2,410229513	
	A0A8M2BHX5_DANRE	lztfl1	-0,380064342	1,872389321	NUD17_DANRE	nudt17	-0,419496441	1,779664437	
	A0A8M2BIB3_DANRE	kng1	-1,418213761	2,338866105	Q08BF1_DANRE	cbe	-1,4326311	3,514234416	
	A0A8M2BIL8_DANRE	elavl1	-0,342426497	1,354875009	Q1QXC3_DANRE	TGM2	-0,915780873	4,564091808	
	A0A8M2BJ62_DANRE	tango2	-1,013239002	1,447193435	Q3MU74_DANRE	C3-1	-1,53653593	2,979000271	
	A0A8M2BK51_DANRE	zgc:152945	-0,884164956	2,29984182	Q3YA99_DANRE	itgb1	-1,649598657	5,012990891	
	A0A8M3AJ9_DANRE	ppcdc	-0,827412882	1,36833416	Q4L216_DANRE	fa18f02	-1,340468491	2,352176889	
	A0A8M3AK66_DANRE	si:ch1073-416d2.3	-1,013052041	1,792641907	Q4V916_DANRE	fdps	-0,390289403	1,546341225	
	A0A8M3AMM6_DANRE	med20	-0,811868727	1,575195257	Q503D8_DANRE	TLP19	-0,548401247	1,431796752	
	A0A8M3AQV6_DANRE	rhot1a	-0,521996694	2,097439051	Q566T6_DANRE	lgals3bp.2	-1,040341178	1,655094357	
	A0A8M3AUZ9_DANRE	gclm	-0,543842175	3,008151109	Q567F7_DANRE	ube2g2	-0,663086244	2,438212413	
	A0A8M3AV96_DANRE	c7a	-1,810705044	2,403703474	Q567K5_DANRE	dcxr	-0,634276545	2,963951314	
	A0A8M3AVE5_DANRE	tsga10	-0,556227153	1,485752644	Q5RHE5_DANRE	si:dkey-90m5.4	-1,58959506	2,72830642	
	A0A8M3AXM8_DANRE	amh	-0,413986547	2,034954876	Q5XJQ9_DANRE	gins1	-0,466242224	1,734922595	
	A0A8M3AY52_DANRE	c8a	-1,624290353	2,070602247	Q5XJ53_DANRE	scp2b	-0,367060505	3,356631634	
	A0A8M3B0L8_DANRE	zgc:153921	-1,671911565	1,906430336	Q64HD0_DANRE	shbgl	-1,453647899	3,478572245	
	A0A8M3B4T5_DANRE	si:ch211-241d21.5	-0,469207992	1,652082863	Q6DG81_DANRE	pls3	-0,914184122	1,465238834	
	A0A8M3B7U7_DANRE	LOC103910098	-1,348035176	2,968545573	Q6DGG2_DANRE	rabif	-0,35707383	1,43379899	
	A0A8M3BDT3_DANRE	zgc:162816	-0,9602977	2,760470299	Q6DHC4_DANRE	Bf-2	-1,122310176	2,503380159	
	DOWN	A0A0R4IDC4_DANRE	si:ch211-195b11.3	-2,862678084	4,75349924	A2BGQ6_DANRE	zgc:91969	-0,700666042	2,446001772
		A0A0R4IKF0_DANRE	apoa1b	-0,959113999	1,384562994	A3KNH4_DANRE	plod3	-0,733900394	2,817996802
		A0A0R4IMB2_DANRE	c3a	-1,965194302	2,433010094	A3KNL9_DANRE	nudt6	-0,72299311	2,590832788
		A0A0R4ITN2_DANRE	gc	-0,791482671	2,501404146	A4FUPO_DANRE	sult2st3	-1,68432351	1,739530251
A0A140LGK1_DANRE		lcp1	-1,131760122	1,561962688	A4IG87_DANRE	serpina10a	-0,733795356	1,964419112	
A0A286YBK3_DANRE		galnt7	-0,644482639	2,175176215	A5WWI5_DANRE	ahsg2	-1,57956733	4,538046796	
A0A2R8QCE4_DANRE		spint1a	-1,583938329	2,406061854	A7E2Q2_DANRE	ambpl	-1,064672005	1,501308224	
A0A2R8QDV2_DANRE		cst14b.1	-0,456623069	1,3029737	A8E4Z6_DANRE	zgc:123103	-1,389525384	4,391978348	
A0A2R8QGCO_DANRE		uba5	-1,453148528	2,964638256	A8E5I4_DANRE	EIF2S1B	-0,623235304	1,343561746	
A0A2R8QI61_DANRE		arl3a	-0,398434464	3,226015384	A8KBB1_DANRE	crp3	-1,484552941	5,872464122	
A0A8M1N0Z5_DANRE		tk2	-0,377088373	1,39960376	A8KBW0_DANRE	zgc:174260	-1,233651365	2,111157364	
A0A8M1N295_DANRE		gpx1b	-1,011385774	1,399452032	A9A1A_DANRE	aldh9a1a	-0,336386063	3,813758976	
A0A8M1N2T9_DANRE		gpx4a	-0,836538682	2,388548937	AASD1_DANRE	aarsd1	-0,864022095	3,153244025	
A0A8M1N370_DANRE		gpx1a	-1,168680971	2,637521927	APOA1_DANRE	apoa1	-1,461626444	3,928649511	
A0A8M1N618_DANRE		gdi1	-0,379531184	1,810088773	APOEB_DANRE	apoeb	-0,579391415	1,736522296	
A0A8M1N710_DANRE		cst327	-0,87545736	2,310963208	ARL3_DANRE	arl3	-0,454429764	2,968966198	
A0A8M1N9N2_DANRE		ces3	-1,403904229	3,384627887	B0RON8_DANRE	si:ch211-133n4.9	-1,962652454	3,992650385	
A0A8M1NA87_DANRE		cfap300	-0,578092143	1,702612229	B0UYS1_DANRE	b2m	-0,67309652	2,133382281	
A0A8M1NBH8_DANRE		cep44	-0,403869423	1,499778369	B2GQV3_DANRE	polr2gl	-0,334967201	1,743829603	
A0A8M1NE27_DANRE		si:dkey-65l23.2	-2,659649239	3,355742662	B2GRU2_DANRE	cirbpa	-0,679520021	1,6671587	
A0A8M1NFY0_DANRE		serpina7	-1,3157673	2,516328331	B3DFP9_DANRE	cb1032	-1,366686455	5,02701459	
A0A8M1NHL5_DANRE		zgc:174260	-1,231393202	2,049458249	B7ZVF7_DANRE	nudt14	-1,031188424	2,899548479	
A0A8M1NIR5_DANRE		gpx3	-0,626288458	1,835560986	B7ZVU8_DANRE	cfap298	-0,416325273	2,550085494	
A0A8M1NUZ9_DANRE		comtd1	-0,867122735	2,040497457	B8JIG4_DANRE	ufsp2	-0,845813033	2,114304969	
A0A8M1NXE0_DANRE		apom	-1,30709797	1,821056454	B8JIME6_DANRE	si:ch1073-126c3.2	-2,063055277	2,301951832	
A0A8M1NZ23_DANRE		c8b	-2,412293434	1,524967525	C1IHU9_DANRE	INTL3	-1,812717366	5,224600001	
A0A8M1PON7_DANRE		tfa	-1,616961763	4,617841015	CAB45_DANRE	sdf4	-0,65868401	4,723317725	
A0A8M1P382_DANRE		c9	-1,652139462	3,202992773	CBO76_DANRE	zgc:101851	-0,644303277	1,583838218	
A0A8M1P7C1_DANRE		c3a	-1,890167209	2,746059592	COPB_DANRE	copb1	-0,970021544	2,004135526	
A0A8M1P7T3_DANRE		nemp1	-0,651879177	2,336323216	COPG2_DANRE	copg2	-0,498666514	2,729265516	
A0A8M1P9S1_DANRE		chia.6	-1,28054784	4,006196779	CREL2_DANRE	creld2	-0,592617956	1,464586424	
A0A8M1PC44_DANRE		strada	-0,610010534	1,960083968	CRGNB_DANRE	crygnb	-0,703041809	2,076449099	

Table S2 (1)

	Entry Name	Gene	log2_fc	log10_pval	Entry Name	Gene	log2_fc	log10_pval
DOWN	AOA8M6YU45_DANRE	serpina1	-1,558169069	2,639989838	Q6IQH0_DANRE	sparc	-0,593876649	1,864283302
	AOA8M6YWJ3_DANRE	LOC101886447	-0,956341647	2,958214063	Q6JWU7_DANRE	copb2	-0,523599349	1,691977439
	AOA8M6YY8_DANRE	cfi	-1,838838351	2,828803242	Q6NW62_DANRE	khdrbs1	-0,366236932	1,58112907
	AOA8M6Z144_DANRE	LOC100535353	-0,729813304	3,734489955	Q6NYN3_DANRE	ipo7	-0,358253421	1,457955086
	AOA8M9NZC6_DANRE	apoa4b.2	-1,213560842	2,274199821	Q6P0B5_DANRE	tbl2	-0,827092195	1,398299354
	AOA8M9P793_DANRE	zgc:162895	-0,343422219	1,6005126	Q6POC4_DANRE	pars2	-0,422732034	2,494984751
	AOA8M9P806_DANRE	zgc:114181	-1,462371345	2,686283114	Q6P2T4_DANRE	rad1	-0,582232195	2,054333414
	AOA8M9PCH5_DANRE	c4	-1,228294352	2,060055543	Q6PFT7_DANRE	cotl1	-0,654629047	2,79407417
	AOA8M9PH65_DANRE	muc5.1	-0,735561064	1,37157357	Q6TH32_DANRE	CFL2	-0,989831992	1,401432745
	AOA8M9PID4_DANRE	c3a.3	-1,360464477	2,868013849	Q6YBS2_DANRE	cap1	-0,593127659	1,476599748
	AOA8M9PLT4_DANRE	LOC103908642	-1,266938511	2,429971546	Q7SYK9_DANRE	amy2a1	-0,944529033	2,344894896
	AOA8M9PPC4_DANRE	bahd1	-0,689372097	2,741264772	Q7ZU12_DANRE	cp	-2,059660176	4,595056678
	AOA8M9PSI6_DANRE	ubr7	-0,787613421	1,716847752	Q7ZVA9_DANRE	hebp2	-0,848316742	2,019266888
	AOA8M9PUU2_DANRE	fanci	-0,346495877	1,376313101	Q7ZVI8_DANRE	npl4	-0,589116064	1,884775266
	AOA8M9Q4F0_DANRE	LOC110439158	-1,206965905	1,852446942	Q7ZVK2_DANRE	ube2g2	-0,397070771	2,249861029
	AOA8M9Q8S1_DANRE	LOC100332358	-1,349925296	2,313427209	Q800S8_DANRE	ahsg	-1,432626717	2,520307409
	AOA8M9Q8S4_DANRE	si:ch211-186e20.7	-1,382541131	2,447169198	Q803N0_DANRE	ankmy2a	-0,579095894	1,656293739
	AOA8M9QHH8_DANRE	itgb1b.2	-1,425667343	2,82033238	Q803Q1_DANRE	gyg1	-0,726542968	3,293858151
	AOA8M9QIU3_DANRE	faf1	-0,389395884	1,434475426	Q803Q7_DANRE	aldoa	-0,448072574	1,572429029
	AOA8M9QPQ0_DANRE	a2ml	-1,595391102	3,648621767	Q8AYE3_DANRE	serpinc1	-1,437276132	3,472387534
AOA8N7T5R7_DANRE	serpinf2a	-1,907334509	3,301115958	Q8JH29_DANRE	agt	-1,522908918	3,048559078	
AOA8N7T8N4_DANRE	LOC571431	-1,6184206	2,808608157	SCG3_DANRE	scg3	-0,728498837	1,581913762	
AOA8N7V0N1_DANRE	serpina1l	-1,500398131	2,498839731	X1WEX1_DANRE	itgae.1	-1,142153184	3,68941854	

Table S2 (2)

Table S3: Quantitative proteomics analysis of sperm from upregulated proteins

	Entry Name	Gene name	log2_fc	log10_pval	Entry Name	Gene name	log2_fc	log10_pval
UP	AOA0M3HEM6_DANRE	rsph1	0,321938347	2,452166082	AOA8M9P048_DANRE	jmjd7	0,490730927	1,860997873
	AOA0R4IAX5_DANRE	misl	0,334673346	1,318738537	AOA8M9PDT4_DANRE	cep162	0,495056201	3,239809826
	AOA0R4ILM6_DANRE	exoc6b	0,339588521	1,37851271	AOA8M9PII8_DANRE	pctp	0,505929022	1,663939612
	AOA0R4INK2_DANRE	uap1	0,344913853	1,532013739	AOA8M9PZG9_DANRE	vapb	0,513623167	1,46235277
	AOA0R4IZ99_DANRE	AFMID	0,353339298	2,175282029	AOA8M9Q165_DANRE	mtch2	0,516605493	1,44168165
	AOA385NIE1_DANRE	selenbp1	0,365715604	2,29520474	AOA8M9Q3D7_DANRE	fahd2a	0,517622266	2,389893812
	AOA8M1N4V6_DANRE	tmem35	0,374324749	1,642895018	AOA8M9QD41_DANRE	zgc:193807	0,517964351	1,665144403
	AOA8M1N5K7_DANRE	c1qbp	0,376656964	2,042737576	AOA8N1TSJ0_DANRE	nipsnap1	0,518195154	2,246526217
	AOA8M1NAB4_DANRE	dek	0,38161591	1,391281851	AOA8N7TBN9_DANRE	cfap43	0,520028754	1,927355893
	AOA8M1NED6_DANRE	rfc1	0,383300912	1,56216293	AOA8N7TDG6_DANRE	nemp2	0,523885553	1,55172761
	AOA8M1P4G3_DANRE	stt3b	0,383906593	1,688826436	AOA8N7UTK4_DANRE	LOC562098	0,531629678	1,699412038
	AOA8M1P653_DANRE	lamtor1	0,387578425	1,384607222	AOA8N7V080_DANRE	pofut1	0,532444079	1,449415987
	AOA8M1QH3_DANRE	rsph4a	0,390217872	1,586077404	A1L230_DANRE	aifm4	0,535177234	1,36247262
	AOA8M1RFE5_DANRE	ube4a	0,399643869	1,433081651	A2THY5_DANRE	mtx1a	0,536183975	1,585871668
	AOA8M1RM80_DANRE	mtrf1l	0,399878252	3,039251549	A3KPZ7_DANRE	slc39a7	0,554237018	2,228905053
	AOA8M1RNE9_DANRE	ccdc180	0,40091419	1,353524034	A5PMJ7_DANRE	stx12	0,555117904	1,542468366
	AOA8M1RRA8_DANRE	si:dkey-57n24.6	0,402896135	1,303487018	A7MCK9_DANRE	sec22l1b	0,557767028	2,002853214
	AOA8M2B1Z5_DANRE	mms19	0,403211689	1,403591616	A7MCR1_DANRE	uqcrfs1	0,560696472	1,485988229
	AOA8M2B3R9_DANRE	aifm4	0,413684141	1,626186318	A8WGC1_DANRE	Ugt2b6	0,56439811	3,391968074
	AOA8M2B7E8_DANRE	cyp2p10	0,42973573	2,1400742037	A8WGS0_DANRE	cyb5a	0,575756742	2,624503602
	AOA8M2B9B7_DANRE	idi1	0,429982126	1,485476403	BOV0W9_DANRE	zgc:55781	0,577306691	1,629771268
	AOA8M2BBE5_DANRE	fam57ba	0,44784351	1,569577425	B2GNX4_DANRE	glrx3	0,584261508	1,830336811
	AOA8M2BD42_DANRE	gpd2	0,450111815	1,313139995	B2GQ61_DANRE	AFMID	0,586773727	1,379827813
	AOA8M2B7E4_DANRE	c2cd2l	0,456275076	2,366642037	B3DIT4_DANRE	vars2	0,588516468	1,624216648
	AOA8M3AIG7_DANRE	slc4a7	0,469415525	4,162674506	B8A5K9_DANRE	SMC2L1	0,588745641	2,080362667
	AOA8M3AQZ6_DANRE	si:dkey-122a22.2	0,476732418	1,350477708	CLPT1_DANRE	clptm1	0,590929383	1,463826022
	AOA8M3B1C6_DANRE	LOC100330159	0,478159376	1,711379364	E7F4M4_DANRE	ccdc105	0,598986921	1,63933803
	AOA8M3BE27_DANRE	btbd16	0,485978894	1,397789319	E7FEZ9_DANRE	atox1	0,602680054	1,442707156
	AOA8M6YVM4_DANRE	si:dkey-211e20.10	0,490285398	1,325234994	ERLN1_DANRE	erlin1	0,604154301	2,504239
	AOA8M6Z3S0_DANRE	zgc:66426	0,490664446	1,436322676	ERLN2_DANRE	erlin2	0,629031399	1,788975713

	Entry Name	Gene name	log2_fc	log10_pval	Entry Name	Gene name	log2_fc	log10_pval
UP	F1QEJ5_DANRE	uqcrq	0,64754737	1,537775088	Q7ZUI4_DANRE	TXN	1,068382907	1,41008493
	F1QHW0_DANRE	cyp20a1	0,653179108	1,882303902	Q7ZUY9_DANRE	itm1	1,098882737	1,975545184
	MAGT1_DANRE	magt1	0,668962471	2,235673846	Q802Z1_DANRE	zmpste24	1,162214829	2,52577619
	PRV2_DANRE	pvalb2	0,671828895	1,630005655	Q803F3_DANRE	pdip5	1,272763207	1,907585897
	Q08CG5_DANRE	rabggta	0,679643563	1,760182591	Q804W0_DANRE	pvalb1	1,334817487	2,267408079
	Q1LY22_DANRE	si:ch211-198o12.4	0,687383329	1,838619469	Q8AW03_DANRE	ndufa6	1,414928047	1,626564488
	Q32LQ2_DANRE	maip1	0,69763628	1,312822763	Q8AYB9_DANRE	rpn1	1,440301234	1,440019652
	Q4V8S5_DANRE	acbd7	0,699421047	3,462975785	RETST_DANRE	retsat	1,564355567	3,629871255
	Q4V8Z6_DANRE	sec62	0,701304685	1,652732265	SPCS2_DANRE	spsc2	1,755248976	1,557352651
	Q4VBR6_DANRE	bcap29	0,708084219	2,121276093	TIM10_DANRE	timm10	1,922092386	4,777793658
	Q5PR41_DANRE	tm7sf2	0,71247871	2,516760729	TM41B_DANRE	tmem41b	2,02094128	5,813515545
	Q5U3T6_DANRE	pmpca	0,732418149	1,353586193	TMM11_DANRE	tmem11	2,225302399	3,183605944
	Q5XJQ1_DANRE	tpk1	0,76702251	1,333150581				
	Q642I9_DANRE	cox6a1	0,77271032	1,972481962				
	Q68EG7_DANRE	morc2	0,774780398	1,597039226				
	Q6DEI4_DANRE	pdia8	0,776079351	2,326128903				
	Q6DG30_DANRE	serpinb1	0,781255113	3,091701166				
	Q6DG72_DANRE	dnase1	0,782896809	2,071486559				
	Q6DHL6_DANRE	rps6	0,788514908	1,772723726				
	Q6DHR2_DANRE	dnajb6a	0,815415268	1,929731924				
	Q6IMW7_DANRE	pvalb4	0,826168495	2,018440635				
	Q6IQ89_DANRE	slc25a11	0,839237301	1,725168183				
	Q6IQK3_DANRE	vamp3	0,840407282	1,770555793				
	Q6IQU9_DANRE	cox5ba	0,848520958	1,47452882				
	Q6NWX2_DANRE	spsc3	0,896787793	1,565074487				
	Q6P980_DANRE	sod2	0,942751068	1,48587111				
	Q6TNV0_DANRE	COX4I1	1,013942829	2,481554419				
	Q7SXZ6_DANRE	ralgs2	1,036515965	1,681967818				
	Q7T2J4_DANRE	adh8b	1,041733839	3,168947675				
	Q7ZT36_DANRE	pvalb3	1,061727272	1,880229586				

Table S3

Table S4: Analysis of KFERQ-like motifs in upregulated proteins from Lamp2a-KO sperm

Up-regulated proteins in Lamp2A-KO/WT					
Gene name	Motifs	Canonical	Phospho.	Acetyl.	No motif
acbd7					1
adh8b	EVRIK KKFKEK			1	
AFMID	QFLSK QVRRS RFLSQ QLKVS EFRKQ	1			
AFMID	QFLSK QVRRS RFLSQ QLKVS EFRKQ	1			
aifm4	KVKVD KKEVK KVKEV			1	
atox1	KLDVK			1	
bcap29	REVRK KRLKE QRLKE	1		1	
btbd16	ERKIK KLKDL			1	
C1QBP	EKKIQ	1			
ccdc105	VRSIQ VLREQ QRERL DVIRK IYRKQ			1	
ccdc180	KWYRQ IDRLK RLKEK KLEKI QFKDF EKRIQ DKLRQ LKLDQ KEVRQ KKEKL KEKLL QIYKR QRDFR RDRFQ QKIEF KIEFR KDIFR KFLEK LRDLLK RDLKQ RFDKK KLRDQ TLLRQ QLSL	1			
cep162	QFLKE QTFKK FKKTQ KLIK KLYLQ QRLLT QRTIR QVEKL VEKLL IERLQ VLREK KVSLLQ QVKEL VKELQ QLSKL RVVEQ LRELQ	1			
cfap43	RFVDK FVDKK RKTLLQ LRSIQ LLKDK QRFSI KVLRD QREVL REVLK IKVEK LELKK KLFER LFERK ERKVK QLSFK FKLEK KLLDK QLYKL QRRID QLEIK KDFRK QTLRI LRITQ RVSKQ QKKIE KKIEI			1	
clptm1	QYRRL VFKDK			1	
COX4L1	QKSLK, QRKYV		1		
COX5B					1
COX6A1					1
cyb5a	VLREQ	1			
cyp20a1					1
cyp2p10	FVREK QRFTF		1		
dek	KDLLK KEFIR			1	
dnajb6a	EKKFK KKFKE KFKEL KRIFE QLKSL QRKEL			1	
dnase1					1
erlin1	QKVVE KVVEK	1			
erlin2	FKSVQ KLTLLQ QKVVE KVVEK KKISQ		1		
exoc6b	QLKEF IDLRQ QKLID TVVKQ	1			
fahd2a	QLTLR		1		
fam57ba					1

Up-regulated proteins in Lamp2A-KO/WT					
Gene name	Motifs	Canonical	Phospho.	Acetyl.	No motif
glrx3	KIDRL QILKD QLYVK	1			
GPD2	QVLER	1			
idi1	KRKEL			1	
itm1					1
jmjd7	QKEFV	1			
lamtor1	QVSKI QIKVD	1			
LOC100330159	KIERL QDLLK LKEIQ LKDRQ LRDVQ KVIEK	1			
LOC562098	KLRRE QLRRE	1			
magt1					1
MAIP1	RLLSQ		1		
misl	QVRLE	1			
mms19	KSIFQ REVQ QRRL QLKEK KEKIL DRVLK QRFFT SKLVQ		1		
morc2	QEVKK KKDLK EKIRQ QIVKT VVEKK VKKFD EKLK			1	
MTCH2					1
mtrf1l	LEVQK, QDLLK	1			
MTX1A	QLERL	1			
NDUFA6					1
nemp2	EFLRQ	1			
nipsnap1	LYKIQ, IKYRQ		1		
pctp					1
pdia8	KEVLR EVLRK KRDLL			1	
pdip5	REVIQ KKDVV	1			
PMPCA	REFIQ	1			
pofut1	DRIVQ	1			
pvalb1					1
pvalb2					1
pvalb3					1
pvalb4					1
rabgta	EKKLK QLLKE QELFR	1			
ralgps2	QTLKI KRLRD QKFVE	1			
retsat	VFDRK DRKLL RRIYQ QLKEL KIKDR			1	

Table S4 (1)

Up-regulated proteins in Lamp2A-KO/WT					
Gene name	Motifs	Canonical	Phospho.	Acetyl.	No motif
rfc1	EKKVK QVKVS QIKIS QKIRS DLRFQ LVDRQ QIRSK IRSKQ SRIIQ QSVKL KDVKK VKKEK		1		
rpn1	KVKDL			1	
rpn1	QLTVR QTRLK QLKDL KVKKD		1		
rps6	QKLIQ QYVVR QRLVT QRTLK		1		
rsph1					1
rsph4a	QKTLF		1		
sec22l1b					1
sec62	KDVKK VKKEK KKKDV KKDVK KDVKK DVKKK KFKLE			1	
selenbp1	EKVIK			1	
serpinb1	KIRDL RDLLK			1	
si:ch211-198o12.4	QEKIL KILDR ILDRQ KEVIR QKDFV	1			
si:dkey-122a22.2	QKYLQ QSKFL KFLER		1		
si:dkey-211e20.10	DVIKK			1	
si:dkey-57n24.6	QTLKL QRVLS LDKLQ QDILK ILKDK	1			
SLC25A11	KTRIQ		1		
slc39a7	KKVVE KDQVV KVVVSQ			1	
slc4a7	DVIKQ DLKRR EKLFQ SFLKQ QFKTK QFFDR FDRIK KIRVE	1			
smc2	KLKEI LKEIQ KVKEL LDLKK DLKKQ KRKEL KELVK VERLK LTKKQ IEKIQ REVIQ KKLLE KLEK VKDIQ QLDLK KRLKE RLKEK LKEKQ LKREQ QKEVI RLREQ KIKEL DLKKK KRIVE QRSLV			1	
sod2					1
spsc2	VKIDK			1	
spsc3	LKDVK			1	
spcf1					1
stt3b	RLTRQ FRVVK QLDFR KDIDL DIRLK			1	
stx12	QKITL RERLQ QKDRL QJFKD	1			
TIM10					1
tm7s2	QFRRD	1			
TMEM11	QKLSR		1		
tmem24	KELKV RLVEK KQVDV QSRLK KLDK			1	
tmem35					1
tmem41b	REKIK			1	

Up-regulated proteins in Lamp2A-KO/WT					
Gene name	Motifs	Canonical	Phospho.	Acetyl.	No motif
tpk1					1
TXN					1
uap1	KTLFQ ERIRK RKLEQ KVVEK EKVFQ	1			
ube4a	FRSRQ QKTLQ QELKV ELKVQ QRVFS KVKDF QTVRV		1		
Ugt2b6	DKLRK			1	
UQCRFS1	KIEIK, KDRVV			1	
UQCRQ					1
vamp3	KVLER			1	
vapb	QRLRE	1			
vars2	LLREQ, EFLKQ, QKVEF, LERLQ, QEKVK, QKKDF, QEVVR	1			
zgc:193807	VFTRQ QRDIL RDLKQ KVVEK EKVVK	1			
zgc:55781	QDRIR SVIRQ QEKVL	1			
zmpste24	QRKIY RFEFQ	1			

Table S4 (2)

Table S5: List of forward and reverse primers used for real-time RT-PCR assays

Transcript	5'- 3' Forward primer	5'- 3' Reverse primer
Dr-lamp2a	GAAGAACTCCTTTAGCACAGCTG	CTAATTGAATTGCTCATAGCCAG
Dr-lamp2b	GAAGAACTCCTTTAGCACAGCCC	CAGTGTCTGATATCCAACATAGG
Dr-lamp2c	GAAGAACTCCTTTAGCACAGGAG	TACAGACTGGTAACCAGTACGAC
Dendra	AAGGGCATCTGCACCATCGG	CGTGCTCGTACAGCTTCACCTTG
Dr-18S	CGTTCTTAGTTGGTGGAGCG	AACGCCACTTGTCCCTCTAA

Table S5

DISCUSSION GÉNÉRALE

Discussion générale

I. Histoire évolutive de la CMA et l'eMi

La CMA est une voie majeure dans le catabolisme lysosomal des protéines cytoplasmiques. Pendant de nombreuses années, les chercheurs pensaient que cette fonction était spécifique des mammifères et des oiseaux, du fait de l'absence de la protéine Lamp2A (une protéine nécessaire à la CMA) chez les autres espèces. Cependant, une récente étude a pu mettre en évidence la présence, chez un grand nombre de poissons, de protéines présentant une forte homologie de séquence avec la protéine Lamp2A de mammifères (Lescat et al., 2018). L'étude de la séquence de ces protéines révélait une bonne conservation de nombreux domaines clés dans le fonctionnement de Lamp2A : la présence du dipeptide GY pour sa translocation au niveau du lysosome ; la présence de 3 acides aminés chargés positivement dans la queue cytosolique nécessaire à la reconnaissance des substrats, ou encore la présence de 1 à 2 Glycines dans la partie transmembranaire permettant la multimérisation de cette protéine. Cette découverte remettait ainsi en question l'idée selon laquelle la CMA n'existerait que chez les tétrapodes (mammifères et oiseaux) et suggérait que cette fonction soit apparue beaucoup plus tôt au cours de l'évolution qu'on ne l'avait initialement cru.

En 2020, des recherches menées par Lescat et al en ont apporté la preuve grâce à l'adaptation à une lignée de fibroblastes de médaka (*Oryzias latipes*) d'une méthode décrite pour mesurer l'activité de la CMA dans des cellules de mammifères. Les résultats obtenus démontraient clairement l'existence ainsi que l'induction d'une activité CMA dans les fibroblastes de médaka mis à jeun. En outre, afin de caractériser le rôle physiologique de cette fonction chez les poissons, les auteurs ont procédé à l'invalidation par *crispR-cas9* de Lamp2A chez le médaka. Les poissons générés (L2AKO) présentaient, à la suite d'un jeûne de courte durée (16h), une hypertrophie du foie, associée à une forte augmentation de la quantité de gouttelettes lipidiques et une réduction légère mais significative de la teneur en glycogène. En outre, plusieurs enzymes impliqués dans différentes voies métaboliques comme la glycolyse (GAPDH, Enolase), le cycle de Krebs (MDH1) ou le stockage des lipides (BHMT) présentaient des niveaux significativement plus élevés chez les poissons L2AKO que chez les témoins, suggérant que des défauts de la dégradation de ces enzymes soient à l'origine des perturbations métaboliques observées. Dans l'ensemble, ces données démontraient l'existence chez le médaka d'une activité CMA et soutenaient ainsi l'idée d'une apparition de cette fonction avec l'émergence du gène *lamp2* au cours de la radiation des vertébrés il y a ~ 550 millions d'années.

Cette découverte soulève un certain nombre d'interrogations que nous allons aborder dans les sections qui suivent.

1. Un même motif pour 2 fonctions différentes ?

Parallèlement à la CMA, il existe une autre fonction catabolique qui prend également en charge la dégradation des protéines présentant un motif KFERQ : la microautophagie endosomale (eMi). Cette fonction se caractérise par le transport de protéines cytosoliques au niveau des endosomes tardifs afin d'y être dégradées. Comme pour la CMA, la prise en charge de ces protéines est réalisée par le biais de la protéine chaperonne HSC70 et de co-chaperonnes. Ce processus nécessite aussi la présence de protéines formant le complexe ESCRT au niveau des endosomes tardifs. Cependant, même si les gènes du complexe ESCRT sont conservés chez l'ensemble des vertébrés (Leung et al., 2008), la fonction eMi n'a pour le moment été décrite

que chez 2 espèces : la souris et la drosophile (Sahu et al., 2011; Uytterhoeven et al., 2015). La souris présente donc à la fois une activité CMA et une activité eMi pour dégrader des protéines présentant le motif KFERQ, alors que la drosophile, ne dispose que de l'eMi. On peut donc s'interroger sur les raisons de la coexistence (au moins chez la souris) de ces 2 fonctions qui prennent en charge les mêmes protéines.

Une des hypothèses pour expliquer cette coexistence est de permettre aux organismes qui en sont pourvus une plus grande plasticité dans les réponses physiologiques, via des régulations différentes de chaque fonction. Récemment, une étude a ainsi pu mettre en évidence, chez des souris modèles de la maladie d'Alzheimer, que l'inhibition de la prise en charge de la forme acétylée de la protéine MAPT (Microtubule-Associated Protein Tau) par la CMA était dans une certaine mesure compensée par une augmentation de l'activité eMI (Caballero et al., 2021).

Comme discuté précédemment, la présence de la fonction eMi n'a pour le moment été décrite que chez la souris et la drosophile (Sahu et al., 2011; Uytterhoeven et al., 2015). Même si l'ensemble des gènes pour la mise en place de l'eMi est présent chez les poissons, nous n'avons, à ce jour, aucune idée de l'existence d'une telle activité chez ces espèces. Dans le cas où cette fonction ne serait pas présente chez les poissons, est-ce que la fonction CMA prend en charge les fonctions de l'eMi ? La CMA a-t-elle évolué en conservant ses fonctions, tout en intégrant celles de l'eMi ? Inversement, il serait intéressant, dans le cas de la drosophile, de savoir si l'absence de la CMA est entièrement comblée par l'unique présence de l'eMi.

2. Une fonction CMA-like chez l'ensemble des téléostéens ?

La découverte de l'existence de la CMA chez le médaka (Lescat et al., 2020), et plus récemment chez la truite (Vélez et al., 2023), nous offre un nouvel angle pour l'étude de cette fonction. Jusqu'à récemment, la CMA était perçue comme une fonction spécifique des tétrapodes. Cependant, la présence de cette fonction chez ces poissons nous permet maintenant d'avoir un aperçu de l'évolution de cette fonction sur plusieurs millions d'années.

L'analyse de la séquence de la protéine Lamp2A du poisson zèbre, et plus largement des Lamp2A exprimés chez l'ensemble des espèces du clade auquel il appartient, montre par exemple la présence de plusieurs divergences structurales par rapport au LAMP2A des mammifères (Fig. 9 & 10). L'une des principales différences que nous pouvons observer est l'absence d'un des 2 domaines LAMP, le domaine N-LAMP. Une étude a pu mettre en évidence que la troncation de ce domaine chez la souris induisait un plus fort assemblage du complexe multimérique de Lamp2A à la surface lysosomale (Terasawa et al., 2016). Le domaine N aurait donc un effet inhibiteur sur la formation du complexe Lamp2A, et donc sur la capacité de la protéine à transloquer les substrats dans le lumen lysosomal. L'absence de ce domaine chez le poisson zèbre (ainsi que chez les autres espèces du même clade) pourrait ainsi influencer sur la régulation même de la fonction tout entière. Curieusement, l'analyse des séquences des LAMP2A de différents mammifères placentaires indique que ce domaine N serait également moins conservé que les autres régions de la protéine (Jalali and Parvaz, 2020). L'ensemble de ces données suggère ainsi qu'un relâchement de la « sélection purifiante » (c'est-à-dire de l'élimination sélective des allèles délétères) pourrait être à l'œuvre au niveau de ce domaine, permettant *in fine* une diversité de régulation de la CMA entre espèces.

Outre cette différence au niveau du domaine N-LAMP, nous avons pu nous rendre compte que l'extrémité C-terminale de la queue cytosolique de Lamp2A du poisson zèbre (ainsi que d'autres espèces du même clade) présentait un acide aminé surnuméraire. L'extrémité C-terminale de Lamp2A est notamment pourvue du motif GYXXF qui est responsable de

l'adressage de LAMP2A à la membrane lysosomale (Cf partie bibliographique du mémoire). Une modification (même mineure) de cette séquence pourrait donc (théoriquement) avoir des conséquences sur la localisation de LAMP2A et donc sur la CMA. Toutefois, une étude récente a démontré que l'ajout d'acides aminés supplémentaires (c'est-à-dire une triple étiquette FLAG) à l'extrémité C-terminale de LAMP2A n'entravait ni son adressage lysosomal ni sa capacité à cibler correctement un substrat bien connu de la CMA (la GAPDH) (Terasawa et al., 2021).

Dans l'ensemble, la démonstration de la présence d'une activité CMA chez le médaka et la truite ainsi que la mise en évidence de l'existence de la protéine LAMP2A chez tous les téléostéens analysés suggère fortement que cette fonction soit bien conservée chez l'ensemble des poissons. Toutefois, les variations de séquence de la protéines LAMP2A entre espèces suggèrait aussi que le rôle de la CMA puisse avoir évolué.

3. Evolution du motif KFERQ-like

Une autre approche pour appréhender l'histoire évolutive de la CMA consiste à analyser la présence ainsi que la structure du motif KFERQ-like chez différentes espèces. L'analyse *in silico* des protéomes de différentes espèces, allant des mammifères (homme, souris, rat) aux poissons (poisson zèbre, médaka, truite), en passant par la drosophile et le vers (*c. elegans*), nous a permis de mettre en évidence que le nombre de protéines présentant un motif KFERQ-like est conservé entre toutes ces espèces, qu'elles possèdent ou non la fonction CMA. Une analyse plus restreinte sur des protéines orthologues entre ces différentes espèces n'a encore une fois pas montré de différences significatives dans le nombre de protéines possédant ce motif. Afin de pousser l'analyse encore plus loin, nous nous sommes également intéressés à la construction même du motif, qui s'est révélée encore une fois très conservée entre ces espèces

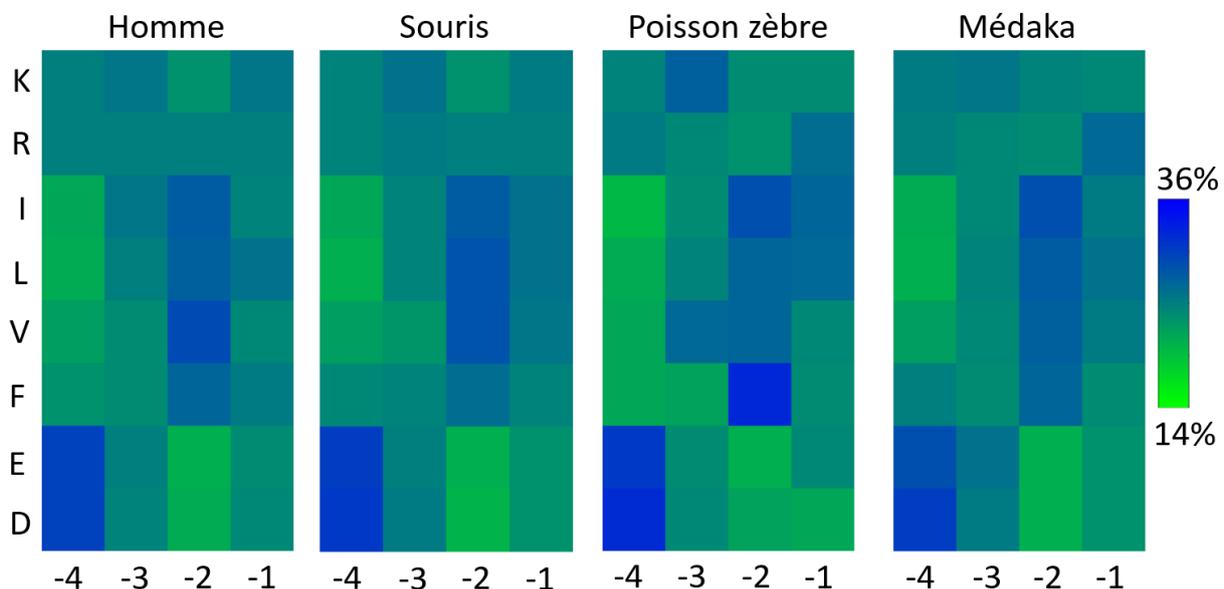


Figure 24 : Composition du motif KFERQ-like canonique entre différentes espèces

A partir des différents motifs KFERQ-like canoniques retrouvés dans les protéines orthologues, le pourcentage d'apparition d'un acide aminé à une place donnée a été évaluée. Cette grille prend en compte les différentes possibilités de construction du motif canonique, avec 1 ou 2 acides aminés basiques (K ou L), 1 ou 2 acides aminés hydrophobes (I, L, V ou F) et 1 acide aminé acide (E ou D). Les positions de ces acides aminés sont relatives à la présence d'une glutamine (Q) et de son éloignement (-1 correspond à l'acide aminé le plus proche de Q et -4 le plus éloigné).

Dans chaque espèce, nous pouvons observé la forte présence d'un acide aminé acide en position -4, alors que l'on retrouve à la position -2 principalement des acides aminés hydrophobe.

(Fig. 24). Néanmoins, l'analyse des motifs KFERQ-like de 21 protéines dont la prise en charge par la CMA a été vérifiée expérimentalement, a mis en évidence une moins bonne conservation du motif entre espèces (y compris entre vertébrés supposés présenter une activité CMA) pour un certain nombre de ces protéines, allant de petites variations qui n'affectent pas les propriétés physico-chimiques du motif à la disparition totale du motif (Fig. 25). Ces résultats suggèrent ainsi la possibilité qu'il existe des différences entre espèces dans la nature du protéome ciblé par la CMA et donc des différences dans le rôle physiologique de cette fonction. On ne peut pas exclure non plus que les modalités de reconnaissance du motif soient différentes entre ces espèces, modifiant ainsi les propriétés de construction de ce motif au sein de ces espèces et donc la nature même du motif. En d'autres termes, la définition de la séquence KFERQ-like est-elle appropriée à toutes les espèces ou uniquement valable pour les mammifères ?

La fonction CMA pourrait donc avoir un impact sur la nature même du motif KFERQ-like et ainsi sur sa conservation au cours de l'évolution. Comme nous avons pu le voir précédemment, toutes les protéines Lamp2A ne sont pas identiques, ce qui pourraient expliquer les changements observés dans les motifs KFERQ-like analysés. Afin de pouvoir tester cette hypothèse, il serait intéressant de tester la prise en charge de différents motifs dans des cellules de poissons. Cela permettrait de vérifier si des modifications dans la séquence et la structure de la protéine Lamp2A induit des changements dans la prise en charge et la dégradation de protéines en fonction des motifs KFERQ-like retrouvés. Dans ce cas, cela signifierait que la CMA n'est pas une fonction figée dans le temps et que l'évolution des protéines clés dans sa mise en place, ici la protéine Lamp2A, induirait des modifications dans les protéines prises en charge par cette fonction et/ou une perte de la conservation d'un motif KFERQ-like retrouvé au sein des protéines cibles.

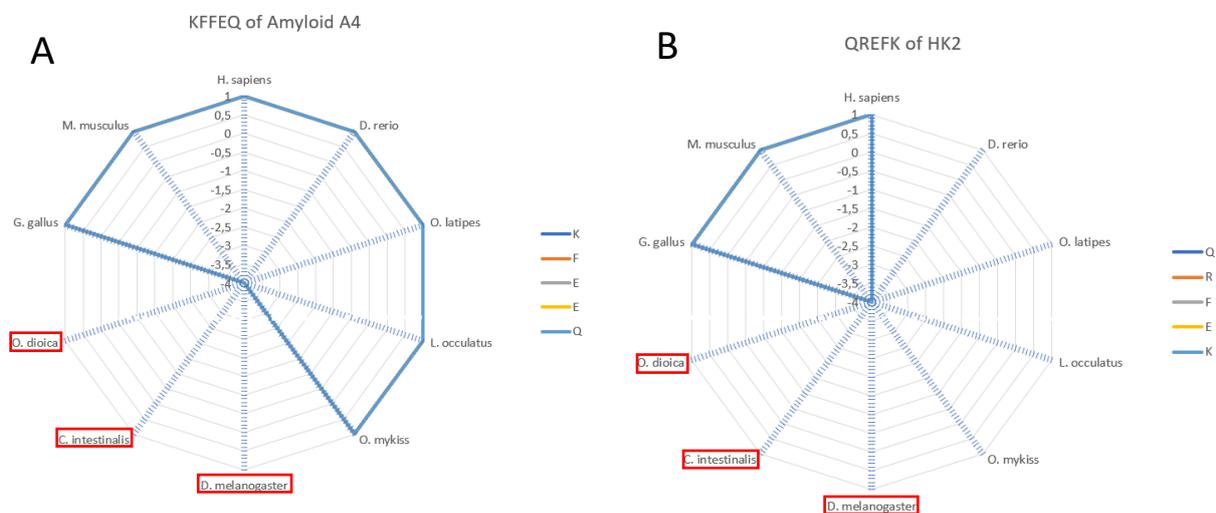


Figure 25 : Conservation de motifs KFERQ-like bona fide entre espèces

Le score de conservation des motifs a été calculé en fonction des acides aminés trouvés au sein des protéines orthologues chez l'ensemble des espèces (via la matrix Blosum62). Si l'acide aminé est identique, le score obtenu est égal à 1. En cas de perte du motif, le score affiché est égal à -4.

- (A) Le motif est retrouvé à l'identique dans l'ensemble des espèces capable d'une activité CMA
- (B) Le motif est retrouvé uniquement chez les tétrapodes (Homme, souris et poulet).

Les espèces encadrées en rouge représentent les espèces qui ne possèdent pas la fonction CMA.

HK2 : Hexokinase 2

II. Présence d'une activité CMA chez le poisson zèbre

Avec les précédentes observations de la présence de la protéine Lamp2A au sein des téléostéens et la conservation d'une activité CMA chez le médaka et la truite, la question de la présence de cette activité CMA chez le poisson zèbre s'est posée au vu des changements que la protéine Lamp2A a subi au cours de l'évolution. Nous nous sommes donc questionnés sur la présence de cette activité CMA chez le poisson zèbre.

1. Une activité CMA-like identique à la fonction décrite chez les mammifères

A l'aide d'un rapporteur fluorescent (KFERQ-Dendra2) précédemment décrit dans les cellules murines (Koga et al., 2011b) et utilisé aussi chez le médaka (Lescat et al., 2020) et plus récemment la truite (Vélez et al., 2023), nous avons pu mettre en évidence la présence d'une activité CMA dans les cellules primaires embryonnaires de poisson zèbre lorsque celles-ci étaient placées dans des conditions de stress oxydatifs et/ou nutritifs. Ces résultats viennent renforcer une nouvelle fois l'idée selon laquelle la CMA n'est pas spécifique des mammifères et des oiseaux mais est présente aussi chez les poissons. Par extension, et compte tenu de la présence du gène *Lamp2* chez l'ensemble des vertébrés, il est donc probable que la CMA, telle que définie actuellement, soit apparue lors de l'émergence des vertébrés il y a ~550 millions d'années.

Nos résultats mettent également en évidence que chez le poisson zèbre la CMA a la capacité de reconnaître la séquence type KFERQ, démontrant une bonne conservation des mécanismes impliqués dans cette fonction cellulaire. Toutefois, une expérience préliminaire (non publiée) effectuée au cours de cette thèse nous a permis de montrer qu'au sein même des motifs KFERQ-like, certains semblent mieux reconnus par la machinerie de la CMA que d'autres, suggérant qu'une redéfinition de ces motifs KFERQ-like est possible. En effet, comme nous avons pu largement en parler précédemment, il est possible que les variations observées dans la séquence de la protéine Lamp2A entre espèces aient pu entraîner un changement dans la reconnaissance et la prise en charge des substrats. De ce fait, on ne peut pas exclure que la nature même des motifs KFERQ-like soit légèrement différente entre espèce. Ceci irait d'ailleurs dans le sens de notre analyse *in silico* révélant des variations (même importante) du motif KFERQ-like au sein de certaines protéines dont la prise en charge par la CMA a été vérifiée expérimentalement chez la souris (Fig. 25). L'ensemble de ces données indique donc que la définition actuelle du motif KFERQ n'est confirmée que pour la souris mais que cette définition peut encore être affinée au sein même de cette espèce, mais également adaptée à d'autres espèces.

Autre fait intéressant, nous avons également pu montrer que les cellules Lamp2A-KO cultivées dans un milieu dépourvu de sérum ne présentaient plus la capacité de former des puncta KFERQ-Dendra2. Un résultat analogue avait été obtenu à partir de cellules de médaka (Lescat et al., 2020) ou de truite arc-en-ciel (Vélez et al., 2023) dont l'expression de *lamp2a* était inhibée par morpholinos ou siRNA. Ces résultats suggèrent que, du moins dans les conditions testées, les cellules de poissons ne sont pas capables de cibler le rapporteur de CMA par l'eMI, ce qui pourrait être dû soit à une absence d'eMI dans ces cellules soit au rapporteur lui-même qui ne porte pas les régions protéiques suffisantes à son ciblage par la machinerie de l'eMI. En ce sens, il a été démontré que le motif KFERQ est nécessaire et suffisant pour une prise en charge par la CMA mais pas par l'eMI (Koga et al., 2011b).

2. Un nouveau modèle pour étudier la CMA

Suite à la découverte de l'existence d'une activité CMA chez le poisson zèbre, nous avons généré une lignée transgénique exprimant de manière ubiquitaire et constitutive le rapporteur KFERQ-Dendra2. Cette lignée (KFERQ-Dendra2) nous permet de déterminer précisément où (dans quel tissu) et quand, la CMA s'active en réponse à différents facteurs nutritionnels (carences en nutriments) ou abiotiques (stress oxydant). Il s'agit là d'un « outil » unique permettant une première appréciation de la régulation et du rôle de cette fonction cellulaire à l'échelle tissulaire et pour la première fois dans un organisme vivant. Il permettra ainsi d'étudier la CMA dans de nombreux contextes de recherche différents.

Comme nous avons pu le mettre en évidence au cours des premiers résultats de cette thèse, l'étude de la CMA au cours des premiers stades de développement est ainsi possible grâce à ce modèle. Grâce au développement de l'embryon à l'extérieur de la mère et à la transparence des embryons, il est très facile de mesurer cette activité à partir du stade « dôme » (6-7h post fécondation) en passant par l'organogenèse et jusqu'à la formation finale de l'alevin. Mais il est aussi possible de se focaliser sur des tissus en particulier et de mesurer si l'activité CMA diffère entre cellules d'un même tissu ou entre tissus.

Un autre intérêt de l'utilisation de ce modèle repose sur sa rapidité à présenter des signes physiologiques liés au vieillissement. Comme cela a déjà pu être décrit, l'activité CMA diminue avec l'âge et est l'un des principaux facteurs de risque associé aux maladies neurodégénératives (Cuervo, 2008; Kiffin et al., 2007). Nous pouvons donc à présent utiliser notre lignée de poissons zèbre KFERQ-Dendra2/Lamp2A-KO comme miroir d'un vieillissement précoce comparé aux individus sauvages KFERQ-Dendra2. Ils permettront alors de mieux comprendre les systèmes mis en place par cette espèce afin de compenser au mieux la perte de la fonction CMA.

Comme nous avons pu en discuter précédemment, la CMA est capable de prendre en charge plus de 60% des protéines de par la présence d'un motif KFERQ-like (Kirchner et al., 2019). Cette fonction peut alors être impliquée dans le contrôle de nombreux processus, qu'ils soient physiologiques comme le cycle cellulaire ou le métabolisme, ou physiopathologiques. Avec plus de 80% de gènes liés à des maladies identiques avec l'homme, de nombreuses pathologies peuvent être caractérisées chez le poisson zèbre (Santoriello and Zon, 2012).

De plus, l'annotation complète du génome du poisson zèbre et l'application de multiples outils génétiques (CRISPR-Cas9, TALEN, morpholinos,...) permet facilement de mettre en place des lignées de poissons zèbre présentant les mutations retrouvées chez l'Homme. Plus de 50 lignées différentes pour différentes maladies génétiques ont pu être générées, comme la myopathie de Duchenne (Bassett and Currie, 2003), la maladie de Charcot-Marie-Tooth (Gonzaga-Jauregui et al., 2015) ou encore la cystinose infantile néphrotique (Elmonem et al., 2017). L'étude de ces maladies chez le poisson zèbre, croisé avec notre rapporteur de la fonction CMA, permettra d'évaluer l'impact de cette fonction au sein de ces maladies.

Au-delà de la modélisation de ces maladies, cette espèce, comparativement aux souris, possède un très fort potentiel pour le screening de molécules dans le but de trouver des composés chimiques capable d'activer la CMA. Grâce à leur transparence, leur petite taille mais aussi la facilité d'administration de ces molécules, le poisson zèbre apporte à la fois la simplicité d'un système de screening haut débit *in vitro* tout en conservant les complexités d'un organisme entier (Early et al., 2018; Mathias et al., 2012). Cette approche, couplée avec notre lignée transgénique KFERQ-Dendra2, permet alors le test de nombreux composés chimiques en parallèle et de pouvoir observer en temps réel les effets de ces composés sur l'activation de la

CMA. Ces résultats offrent aussi un aperçu de l'efficacité d'activation de la CMA entre ces différents composés, ce qui permet de pouvoir les sélectionner pour prolonger ces tests dans des poissons zèbre adultes. Dans ce cas, une fois la liste de composés restreinte, il est possible de les administrer directement dans des poissons zèbre pour vérifier les conséquences physiologiques de l'activation de la CMA. *In fine*, ces tests ouvrent aussi la voie à l'utilisation et la confirmation de ces composés chimiques dans d'autres espèces au cours d'essais cliniques.

III. Rôle de la CMA dans la spermatogénèse

L'analyse et la caractérisation par microscopie confocale haute résolution de notre lignée KFERQ-Dendra2 a mis en évidence, de façon inattendue, une forte régionalisation de l'activité de la CMA dans les gonades. Dans les testicules, la CMA semble n'être activée que dans les cellules de Sertoli, tandis que dans les ovaires, le rapporteur de la CMA n'est activé que dans les cellules appelées granulosa entourant les oocytes. Ces résultats, ou du moins ceux concernant les testicules, semblent être en accord avec de récentes données de séquençage des ARNm sur cellules uniques (plus couramment appelé « single cell sequencing ») montrant chez un grand nombre d'espèces animales une expression du gène *LAMP2* restreinte aux cellules de Sertoli (Murat et al., 2023). Cette étude montre notamment une forte conservation de ce profil d'expression au cours de l'évolution, suggérant l'existence d'une pression de sélection pour maintenir une forte expression de ce gène dans les cellules de Sertoli. On peut toutefois regretter que ces données portent sur le gène *LAMP2* dans sa globalité sans qu'il y ait de distinction entre les différentes formes d'épissages alternatifs *LAMP2A*, *LAMP2B* et *LAMP2C*. Quoi qu'il en soit, nos résultats valident l'utilité de notre lignée KFERQ-Dendra2 en tant qu'« outil » pertinent pour l'étude de la CMA à l'échelle cellulaire au sein d'un organisme. Ils nous ont incité à approfondir nos recherches pour déterminer si la CMA assure un rôle particulier dans la spermatogénèse.

Compte tenu du rôle majeur des cellules de Sertoli dans le soutien du processus de développement des cellules germinales (Hayashi and Matsui, 2022), nous avons comparé les structures des testicules entre nos poissons zèbre sauvages et *Lamp2A-KO*. Les observations histologiques et la quantification des différents types cellulaires ont révélé une légère augmentation du nombre de spermatozoïdes chez les poissons *Lamp2A-KO*. Forts de cette constatation et afin de caractériser plus précisément les possibles conséquences d'une absence d'activité CMA, nous avons porté notre attention aux spermatozoïdes. Pour cela, des analyses de motilité ont été effectuées grâce au CASA (Computed-Assisted Sperm Analysis) et celles-ci ont révélé une baisse significative de la motilité des spermatozoïdes issus des poissons *Lamp2A-KO*. Ces données montraient donc pour la première fois que l'absence d'activité CMA empêche la formation de spermatozoïdes actifs. Plusieurs facteurs peuvent être impliqués dans cet effet. Ils seront discutés dans les sections qui suivent.

1. La piste des mitochondries

a. Mitochondries dysfonctionnelles dans les spermatozoïdes des poissons Lamp2A-KO

Dans le but de décrire au mieux les perturbations induites par l'absence d'activité CMA, nous avons dans un premier temps réalisé une analyse protéomique des spermatozoïdes issus des poissons WT et *Lamp2a-KO*. Nous avons pu mettre en évidence une perturbation du niveau

de nombreuses protéines en lien avec la régulation de l'activité mitochondriale, comme des protéines localisées dans la membrane mitochondriale ou des protéines impliquées dans le transport d'électrons et ou de la chaîne respiratoire. Afin de confirmer ces résultats, nous avons vérifié les fonctions des mitochondries au sein de ces spermatozoïdes. Ces expériences ont pu mettre en évidence une baisse significative du potentiel membranaire mitochondrial dans les spermatozoïdes CMA incompetent.

Les mitochondries sont essentielles à l'apport d'énergie nécessaire pour la mobilité des spermatozoïdes, et cet apport est modulé par le nombre et « l'état de santé » des mitochondries (Gu et al., 2019; Schmidt and Carter, 2016). De ce fait, les fonctions mitochondriales impactent fortement la qualité des spermatozoïdes, et des perturbations dans la chaîne de transport des électrons dégradent la qualité générale des spermatozoïdes (Boguenet et al., 2021; Ruiz-Pesini et al., 2000).

Outre leur rôle en tant que pourvoyeur d'énergie, les mitochondries sont au centre de l'équilibre redox des spermatozoïdes (Boguenet et al., 2021). Il est aujourd'hui clairement établi qu'un défaut au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale engendre une production anormale d'espèces réactives de l'oxygène (plus communément appelées ROS pour Reactive Oxygen Species) et entraîne une baisse de la motilité des spermatozoïdes (Nowicka-Bauer and Nixon, 2020). Afin de gérer une surproduction de ROS par les mitochondries, différents systèmes sont mis en place, comme la présence de Superoxyde Dismutase (SOD), qui permet la réduction du superoxyde (O_2^-) en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) avant d'être exporté vers le cytoplasme (Koppers et al., 2008). En ce sens, les résultats obtenus dans notre étude montrent une accumulation de la protéine SOD2 dans nos spermatozoïdes Lamp2A-KO, ce qui pourrait refléter la présence d'un stress oxydant.

b. Mitochondries dysfonctionnelles dans les testicules des poissons Lamp2A-KO

Afin de parfaire notre compréhension des événements cellulaires en jeu suite à l'inactivation de la CMA, nous avons réalisé une seconde analyse protéomique à partir d'extraits protéiques issus de testicules des poissons WT et Lamp2A-KO. Les résultats obtenus (actuellement en cours d'analyse) mettent en évidence une accumulation de protéines en lien avec la régulation de l'activité mitochondriale dans les testicules des poissons Lamp2A-KO par rapport à leur homologue WT (Fig. 26).

Outre leur rôle dans la motilité des spermatozoïdes, les mitochondries sont également importantes au bon déroulement de la spermatogenèse. La perturbation des fonctions mitochondriales, en absence de la CMA, peut avoir des conséquences importantes sur l'ensemble de ce processus.

En effet, durant les premiers stades de la spermatogenèse, au stade spermatogonies, celles-ci utilisent principalement du glucose pour produire de l'énergie via la glycolyse alors que les spermatocytes et spermatides privilégient le lactate provenant des cellules de Sertoli (Bajpai et al., 1998). Ce lactate est converti en pyruvate, qui sera ensuite utilisé par les mitochondries afin de produire de l'ATP, essentiel au développement et à la survie des spermatocytes et des spermatides (Erkkilä et al., 2002; Varuzhanyan and Chan, 2020).

Parallèlement à ce mécanisme, les cellules de Sertoli dégradent certaines cellules germinales devenues apoptotiques. Cette phagocytose permet la récupération de lipides et l'augmentation de la concentration en long-chain acyl-CoA déshydrogénase dans les mitochondries de cellules de Sertoli afin de générer de l'énergie (Xiong et al., 2009). Il s'agit là d'un mécanisme important pour maintenir l'activité métabolique des cellules de Sertoli et soutenir le développement des cellules germinales (Xiong et al., 2009).

Cette activité métabolique via les mitochondries est étroitement contrôlée par les cellules de Sertoli elles-mêmes qui sont capables de réguler la biogenèse des mitochondries et l'activité OXPHOS dans les cellules germinales (Boussouar and Benahmed, 2004). La sécrétion par les cellules de Sertoli de l'Activine A, induit par exemple la biogenèse mitochondriale, la formation de nombreuses crêtes et l'élongation de celles-ci dans les spermatocytes et les spermatides (Meinhardt et al., 2000).

A noter aussi que les mitochondries dans les cellules de Leydig, à défaut d'être d'importantes génératrices d'ATP, sont spécialisées dans la production d'hormones (Martin, 2016; Prince, 2002). En présence de LH, le cholestérol va être importé dans la membrane mitochondriale pour initier la production de testostérone (McLachlan et al., 2002).

L'ensemble de ces données montre clairement que les mitochondries ont un rôle central dans le bon déroulement de la spermatogenèse et de la motilité des spermatozoïdes. Des perturbations de leurs fonctions peuvent entraîner de nombreuses conséquences, menant pour la plupart à des défauts de production de spermatozoïdes actifs. De nombreuses questions restent néanmoins sans réponse concernant le rôle de la CMA dans ces effets. La présence du motif KFERQ-like au sein de nombreuses protéines mitochondriales suggère que la CMA puisse agir directement dans leur prise en charge et donc dans le contrôle de leur disponibilité dans les cellules de Sertoli. Toutefois, cela reste à être prouvé.

2. La piste du cytosquelette

Le cytosquelette est un acteur important de la spermatogenèse. Il intervient dans de nombreux événements conduisant à la production de spermatozoïdes actifs, tels que la formation de l'acrosome, l'élimination du cytoplasme, l'allongement de la tête et le développement du flagelle du spermatozoïde, ou encore leur motilité (Dunleavy et al., 2019).

a. Désorganisation du cytosquelette dans les testicules des poissons Lamp2A-KO ?

L'analyse protéomique effectuée à partir des extraits protéiques issus des testicules de poissons WT et Lamp2A-KO a mis en évidence une accumulation des protéines PDLIM1, PDLIM3a et PDLIM7 dans les testicules de nos poissons mutants (Fig. 26). Or, chez la souris, PDLIM1 est reconnue comme un régulateur négatif de l'organisation du cytosquelette dans les spermatides (Liu et al., 2016). En condition normale, cette protéine est dégradée via la macroautophagie, ce qui permet le bon assemblage des structures contenant de l'actine et des microtubules. Son accumulation dans les cellules de Sertoli entraîne une désorganisation des tubules séminifères associée à une rupture des spécialisations ectoplasmiques apicales (Liu et al., 2016).

De façon intéressante, les résultats obtenus par protéomique montrent une baisse significative du niveau de la protéine ATG9b (une protéine clé de l'initiation de la macroautophagie (Wang et al., 2017)) dans les testicules de nos poissons Lamp2A-KO par rapport aux poissons sauvages.

L'ensemble de ces données suggère ainsi qu'un mécanisme similaire à celui décrit par Liu et al. pourrait être à l'œuvre chez nos poissons Lamp2A-KO (Liu et al., 2016). Toutefois, le lien entre une absence d'activité CMA et une inhibition de la macroautophagie reste à être élucidé. Notons également que les protéines PDLIM1, PDLIM3a et PDLIM7 présentent des motifs KFERQ-like dans leur séquence, et donc que leur accumulation chez les poissons Lamp2A-KO pourrait être directement liée à une absence d'activité CMA.

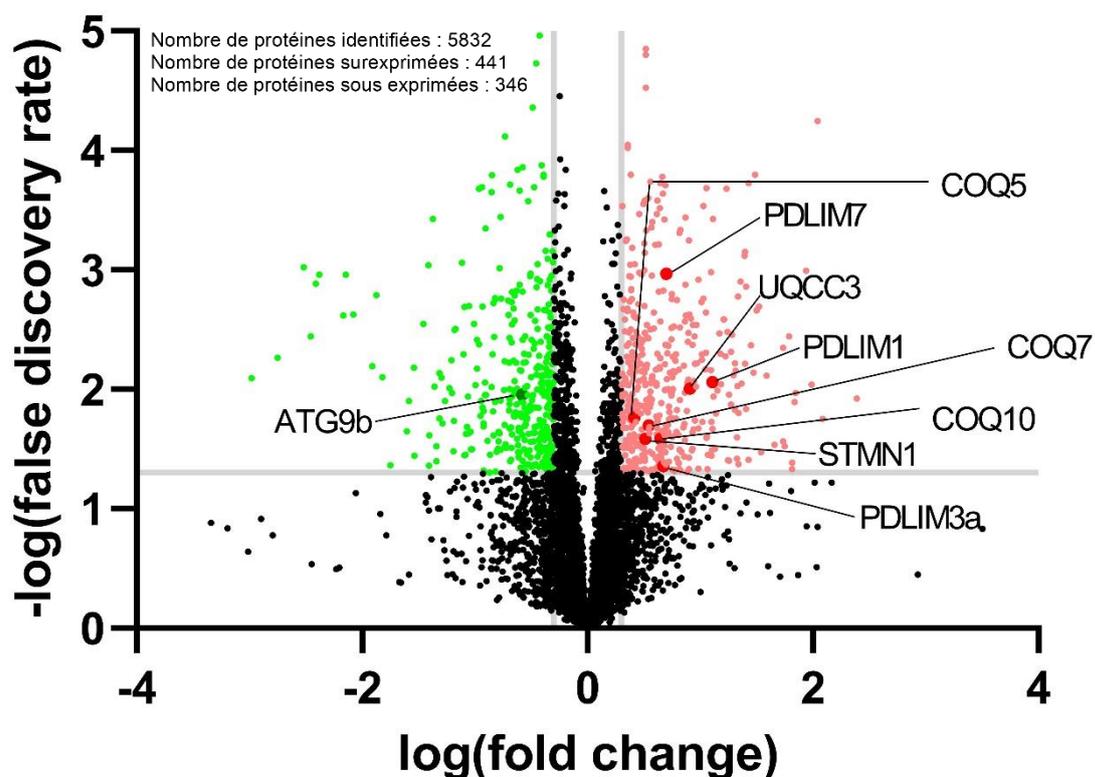


Figure 26 : Analyse protéomique quantitative des testicules de poisson zèbre LAMP2A-KO vs WT

Les points verts et rouges représentent les protéines significativement sous et sur exprimées respectivement ($p < 0.05$) et fold change > 1.3).

Outre les protéines PDLIM, Nous avons pu observer une accumulation de la Stathmine (Stmn1) dans nos extraits protéiques de testicules Lamp2A-KO (Fig. 26). Cette protéine est connue pour désorganiser les réseaux de microtubules et ainsi perturber plus globalement le cytosquelette (Rubin and Atweh, 2004). Son accumulation a déjà été montrée dans des cellules de souris dépourvues de la protéine ATG7 et donc de macroautophagie (Zhuo et al., 2013). Nous pouvons donc supposer que la forte présence de cette protéine dans les testicules de nos poissons Lamp2A-KO puisse entraîner des conséquences similaires à celles observées dans les cellules de souris déficiente en macroautophagie. Notons que cette protéine présente également un motif

KFERQ-like et qu'il n'est donc pas exclu que son accumulation soit aussi directement liée à une absence d'activité CMA.

L'ensemble de ces données suggère que les testicules issus des poissons Lamp2A-KO présentent des défauts du cytosquelette. Il serait intéressant de vérifier l'état des tubes séminifères dans ces testicules ainsi que le cytosquelette dans les cellules de Sertoli avec des colorations en phalloïdine. L'état d'activation de la macroautophagie devra aussi être déterminé. Enfin, il serait intéressant de vérifier si ces protéines peuvent être prises en charge par la CMA car elles possèdent toutes au moins 1 motif KFERQ-like dans leurs séquences. Dans le but de vérifier cette hypothèse, il serait possible de tester la reconnaissance du motif en injectant directement celui-ci dans des embryons de poisson zèbre (avec un marqueur fluorescent) et de quantifier la dégradation du signal dans le temps. Aussi, l'insertion de mutations de ces motifs KFERQ-like au cœur des protéines pourrait être envisagée, confirmant alors la prise en charge de ces protéines par la CMA via ces motifs en particulier.

b. Désorganisation du cytosquelette dans les spermatozoïdes des poissons Lamp2A-KO ?

L'analyse protéomique effectuée à partir d'extraits protéiques des spermatozoïdes issus des poissons WT et Lamp2A-Ko a révélé une accumulation de protéines liées à la structure du cytosquelette des spermatozoïdes. Il s'agit des protéines Rsph1 (Radial Spoke Head 1) et Rsph4, ou bien encore Cfap43 (Cilia- and Flagella-Associated Protein 43) et Spef1 (Sperm Flagellar protein 1) (Cf Papier 2, Table S3). Ces protéines ont été décrites comme centrales pour la formation de l'axonème et essentielles à la motilité du flagelle en se fixant au niveau de la paire de centrale de microtubules (Yu et al., 2021; Zheng et al., 2019).

3. Baisse de la réaction de phase aiguë

Outre l'impact sur l'activité mitochondriale et le cytosquelette, notre analyse semble indiquer une baisse du niveau de nombreuses protéines (plus d'une trentaine) liées à la Réaction de Phase Aiguë (APR pour Acute Phase Response). Cette réponse est le plus souvent mise en place au cours d'une infection, ou lors de la présence d'une inflammation (Jain et al., 2011). Toutes les protéines retrouvées dans notre analyse font parties des protéines qui jouent un rôle dans la mise en place de cette réaction, telles que la céruloplasmine, les facteurs liés au complément (C2, C3a, C4), la prothrombine ou le plasminogène. Elles sont impliquées dans différents modes d'action, comme le transport de protéines, la coagulation ou dans la mise en place d'une réaction immunitaire avec les protéines liées au complément (Jain et al., 2011). Leurs niveaux dans les spermatozoïdes ont été associés à la qualité de le semence (Ciereszko et al., 2017). De ce fait leur diminution chez les KO pourrait refléter une mauvaise qualité.

CONCLUSION

Conclusion générale

Les travaux effectués au cours de ma thèse démontrent clairement l'intérêt et la pertinence du poisson zèbre en tant que modèle d'étude pour étudier la CMA.

D'une part, l'analyse de l'histoire évolutive de la CMA a confirmé la présence de l'ensemble des acteurs nécessaires à son fonctionnement chez cette espèce, ainsi que chez l'ensemble des téléostéens. Malgré des divergences structurelles dans les domaines clés de la protéine LAMP2A, la fonction CMA demeure conservée chez plusieurs espèces de poissons, notamment le médaka, la truite, et désormais le poisson zèbre. Ces observations constituent une certaine rupture dans notre compréhension de l'évolution de cette fonction, jusqu'à présent considérée être spécifique des tétrapodes. La prise en compte des poissons dans l'étude de la CMA offre ainsi aux chercheurs une perspective plus large pour l'analyse de cette fonction, ainsi que de son interaction avec l'eMI. En effet, les poissons téléostéens, qui ont divergé de la lignée des tétrapodes au début de l'évolution des vertébrés, constituent des modèles attrayants et uniques à l'interface fonctionnelle entre les invertébrés (supposés ne pas avoir d'activité CMA, mais s'appuyant sur l'eMI pour cibler les protéines contenant des motifs de type KFERQ) et les mammifères (utilisant à la fois les fonctions eMI et CMA), pour l'étude de l'interaction entre ces deux voies apparentées. Concernant la CMA, les différences structurelles existantes entre espèces dans certaines domaines clés de LAMP2A représentent également de précieux atouts pour améliorer notre compréhension de la relation structure/fonction de cette protéine.

Outre ces considérations, nos données démontrent clairement que le poisson zèbre dispose de nombreux avantages en tant que modèle animal pour étudier la CMA. Nous avons ainsi pu établir une lignée transgénique « rapporteur de l'activité CMA » nous permettant de suivre et quantifier l'activité de cette fonction à l'échelle cellulaire et tissulaire. Les résultats obtenus durant cette thèse montrent notamment que cette lignée permet de distinguer, au sein d'un même tissu, les cellules présentant une activité CMA de celles qui n'en présentaient pas, représentant ainsi un avantage certain pour affiner notre compréhension du rôle de cette fonction.

Outre la lignée « rapporteur de CMA », nous avons également générer des poissons déficients en Lamp2A (lignée Lamp2A-KO) permettant de mieux appréhender le(s) rôle(s) cellulaire et physiologique de la CMA. Ils nous ont notamment permis de dévoiler un rôle de la CMA, jusque-là inconnu, dans la spermatogenèse et la production de spermatozoïdes actifs. Bien que les mécanismes sous-jacents ne soient pas encore clairement identifiés, l'analyse des poissons Lamp2A-KO semble indiquer que des défauts au niveau des mitochondries et/ou du cytosquelette puissent y jouer un rôle.

Dans l'ensemble les résultats acquis durant cette thèse mettent clairement en évidence l'intérêt que peut représenter le poisson zèbre en tant que nouveau modèle d'étude de la CMA. Ces nombreux avantages (génétique, reproductif, ...) en feront un modèle puissant pour accélérer l'acquisition de connaissances sur cette fonction. Sa position phylogénétique est également un atout précieux permettant d'étudier cette fonction sous un angle évolutif.

REFERENCE

- Abou-Haila, A., Tulsiani, D.R., 2000. Mammalian sperm acrosome: formation, contents, and function. *Arch Biochem Biophys* 379, 173–182. <https://doi.org/10.1006/abbi.2000.1880>
- Agarraberes, F.A., Terlecky, S.R., Dice, J.F., 1997. An intralysosomal hsp70 is required for a selective pathway of lysosomal protein degradation. *J Cell Biol* 137, 825–834. <https://doi.org/10.1083/jcb.137.4.825>
- Ahmed, N., Liu, Y., Chen, H., Yang, P., Waqas, Y., Liu, T., Gandahi, J.A., Huang, Y., Wang, L., Song, X., Rajput, I.R., Wang, T., Chen, Q., 2016. Novel cellular evidence of lipophagy within the Sertoli cells during spermatogenesis in the turtle. *Aging (Albany NY)* 9, 41–51. <https://doi.org/10.18632/aging.101070>
- Akerfeldt, K., 2000. Guidebook to Molecular Chaperones and Protein-Folding Catalysts. Mary-Jane Gething. *The Quarterly Review of Biology* 75, 48–49. <https://doi.org/10.1086/393278>
- Alfaro, I.E., Albornoz, A., Molina, A., Moreno, J., Cordero, K., Criollo, A., Budini, M., 2018. Chaperone Mediated Autophagy in the Crosstalk of Neurodegenerative Diseases and Metabolic Disorders. *Front Endocrinol (Lausanne)* 9, 778. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00778>
- Almeida, F.F.L., Taranger, G.L., Norberg, B., Karlsen, O., Bogerd, J., Schulz, R.W., 2009. Photoperiod-modulated testis maturation in Atlantic cod (*Gadus morhua*, L.). *Biol Reprod* 80, 631–640. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.071340>
- Alsop, D., Matsumoto, J., Brown, S., Van Der Kraak, G., 2008. Retinoid requirements in the reproduction of zebrafish. *Gen Comp Endocrinol* 156, 51–62. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2007.11.008>
- Andersson, F.I., Werrell, E.F., McMorran, L., Crone, W.J.K., Das, C., Hsu, S.-T.D., Jackson, S.E., 2011. The effect of Parkinson's-disease-associated mutations on the deubiquitinating enzyme UCH-L1. *J Mol Biol* 407, 261–272. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.12.029>
- Anguiano, J., Garner, T.P., Mahalingam, M., Das, B.C., Gavathiotis, E., Cuervo, A.M., 2013. Chemical modulation of chaperone-mediated autophagy by retinoic acid derivatives. *Nat Chem Biol* 9, 374–382. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1230>
- Angulo, C., Rauch, M.C., Droppelmann, A., Reyes, A.M., Slebe, J.C., Delgado-López, F., Guaiquil, V.H., Vera, J.C., Concha, I.I., 1998. Hexose transporter expression and function in mammalian spermatozoa: cellular localization and transport of hexoses and vitamin C. *J Cell Biochem* 71, 189–203.
- Aparicio, I.M., Espino, J., Bejarano, I., Gallardo-Soler, A., Campo, M.L., Salido, G.M., Pariente, J.A., Peña, F.J., Tapia, J.A., 2016. Autophagy-related proteins are functionally active in human spermatozoa and may be involved in the regulation of cell survival and motility. *Sci Rep* 6, 33647. <https://doi.org/10.1038/srep33647>
- Arias, E., Koga, H., Diaz, A., Mocholi, E., Patel, B., Cuervo, A.M., 2015. Lysosomal mTORC2/PHLPP1/Akt regulate chaperone-mediated autophagy. *Mol Cell* 59, 270–284. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.05.030>
- Assis, L.H.C., Crespo, D., Morais, R.D.V.S., França, L.R., Bogerd, J., Schulz, R.W., 2016. INSL3 stimulates spermatogonial differentiation in testis of adult zebrafish (*Danio rerio*). *Cell Tissue Res* 363, 579–588. <https://doi.org/10.1007/s00441-015-2213-9>
- Bajpai, M., Gupta, G., Setty, B.S., 1998. Changes in carbohydrate metabolism of testicular germ cells during meiosis in the rat. *Eur J Endocrinol* 138, 322–327. <https://doi.org/10.1530/eje.0.1380322>

- Bandyopadhyay, U., Kaushik, S., Varticovski, L., Cuervo, A.M., 2008. The Chaperone-Mediated Autophagy Receptor Organizes in Dynamic Protein Complexes at the Lysosomal Membrane. *Mol Cell Biol* 28, 5747–5763. <https://doi.org/10.1128/MCB.02070-07>
- Bassett, D.I., Currie, P.D., 2003. The zebrafish as a model for muscular dystrophy and congenital myopathy. *Hum Mol Genet* 12 Spec No 2, R265-270. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddg279>
- Bauer, P.O., Goswami, A., Wong, H.K., Okuno, M., Kurosawa, M., Yamada, M., Miyazaki, H., Matsumoto, G., Kino, Y., Nagai, Y., Nukina, N., 2010. Harnessing chaperone-mediated autophagy for the selective degradation of mutant huntingtin protein. *Nat Biotechnol* 28, 256–263. <https://doi.org/10.1038/nbt.1608>
- Berger, J., Currie, P.D., 2012. Zebrafish models flex their muscles to shed light on muscular dystrophies. *Dis Model Mech* 5, 726–732. <https://doi.org/10.1242/dmm.010082>
- Berghmans, S., Jette, C., Langenau, D., Hsu, K., Stewart, R., Look, T., Kanki, J.P., 2005. Making waves in cancer research: new models in the zebrafish. *Biotechniques* 39, 227–237. <https://doi.org/10.2144/05392RV02>
- Bergmann, M., Schindelmeiser, J., Greven, H., 1984. The blood-testis barrier in vertebrates having different testicular organization. *Cell Tissue Res.* 238, 145–150. <https://doi.org/10.1007/BF00215155>
- Berthelot, C., Brunet, F., Chalopin, D., Juanchich, A., Bernard, M., Noël, B., Bento, P., Da Silva, C., Labadie, K., Alberti, A., Aury, J.-M., Louis, A., Dehais, P., Bardou, P., Montfort, J., Klopp, C., Cabau, C., Gaspin, C., Thorgaard, G.H., Boussaha, M., Quillet, E., Guyomard, R., Galiana, D., Bobe, J., Volf, J.-N., Genêt, C., Wincker, P., Jaillon, O., Roest Crollius, H., Guiguen, Y., 2014. The rainbow trout genome provides novel insights into evolution after whole-genome duplication in vertebrates. *Nat Commun* 5, 3657. <https://doi.org/10.1038/ncomms4657>
- Boguenet, M., Bouet, P.-E., Spiers, A., Reynier, P., May-Panloup, P., 2021. Mitochondria: their role in spermatozoa and in male infertility. *Hum Reprod Update* 27, 697–719. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmab001>
- Bosseboeuf, A., Gautier, A., Auvray, P., Mazan, S., Sourdaine, P., 2014. Characterization of spermatogonial markers in the mature testis of the dogfish (*Scyliorhinus canicula* L.). *Reproduction* 147, 125–139. <https://doi.org/10.1530/REP-13-0316>
- Boussouar, F., Benahmed, M., 2004. Lactate and energy metabolism in male germ cells. *Trends Endocrinol Metab* 15, 345–350. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2004.07.003>
- Bowles, J., Knight, D., Smith, C., Wilhelm, D., Richman, J., Mamiya, S., Yashiro, K., Chawengsaksophak, K., Wilson, M.J., Rossant, J., Hamada, H., Koopman, P., 2006. Retinoid signaling determines germ cell fate in mice. *Science* 312, 596–600. <https://doi.org/10.1126/science.1125691>
- Caballero, B., Bourdenx, M., Luengo, E., Diaz, A., Sohn, P.D., Chen, X., Wang, C., Juste, Y.R., Wegmann, S., Patel, B., Young, Z.T., Kuo, S.Y., Rodriguez-Navarro, J.A., Shao, H., Lopez, M.G., Karch, C.M., Goate, A.M., Gestwicki, J.E., Hyman, B.T., Gan, L., Cuervo, A.M., 2021. Acetylated tau inhibits chaperone-mediated autophagy and promotes tau pathology propagation in mice. *Nat Commun* 12, 2238. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22501-9>
- Cabezas-Sainz, P., Guerra-Varela, J., Carreira, M.J., Mariscal, J., Roel, M., Rubiolo, J.A., Sciara, A.A., Abal, M., Botana, L.M., López, R., Sánchez, L., 2018. Improving zebrafish embryo xenotransplantation conditions by increasing incubation temperature and establishing a proliferation index with ZFtool. *BMC Cancer* 18, 3. <https://doi.org/10.1186/s12885-017-3919-8>

- Campbell, B.K., Souza, C., Gong, J., Webb, R., Kendall, N., Marsters, P., Robinson, G., Mitchell, A., Telfer, E.E., Baird, D.T., 2003. Domestic ruminants as models for the elucidation of the mechanisms controlling ovarian follicle development in humans. *Reprod Suppl* 61, 429–443.
- Chang, W.-L., Cui, L., Gu, Y., Li, M., Ma, Q., Zhang, Z., Ye, J., Zhang, F., Yu, J., Gui, Y., 2019. TBC1D20 deficiency induces Sertoli cell apoptosis by triggering irreversible endoplasmic reticulum stress in mice. *Mol Hum Reprod* 25, 773–786. <https://doi.org/10.1093/molehr/gaz057>
- Chen, C., Ouyang, W., Grigura, V., Zhou, Q., Carnes, K., Lim, H., Zhao, G.-Q., Arber, S., Kurpios, N., Murphy, T.L., Cheng, A.M., Hassell, J.A., Chandrashekar, V., Hofmann, M.-C., Hess, R.A., Murphy, K.M., 2005. ERM is required for transcriptional control of the spermatogonial stem cell niche. *Nature* 436, 1030–1034. <https://doi.org/10.1038/nature03894>
- Chen, S.X., Bogerd, J., Schoonen, N.E., Martijn, J., de Waal, P.P., Schulz, R.W., 2013. A progestin (17 α ,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one) stimulates early stages of spermatogenesis in zebrafish. *Gen Comp Endocrinol* 185, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2013.01.005>
- Cheng, C.Y., Mruk, D.D., 2012. The blood-testis barrier and its implications for male contraception. *Pharmacol Rev* 64, 16–64. <https://doi.org/10.1124/pr.110.002790>
- Chiavacci, E., Rizzo, M., Pitto, L., Patella, F., Evangelista, M., Mariani, L., Rainaldi, G., 2015. The zebrafish/tumor xenograft angiogenesis assay as a tool for screening anti-angiogenic miRNAs. *Cytotechnology* 67, 969–975. <https://doi.org/10.1007/s10616-014-9735-y>
- Chino, H., Mizushima, N., 2020. ER-Phagy: Quality Control and Turnover of Endoplasmic Reticulum. *Trends Cell Biol* 30, 384–398. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2020.02.001>
- Christoffels, A., Koh, E.G.L., Chia, J.-M., Brenner, S., Aparicio, S., Venkatesh, B., 2004. Fugu genome analysis provides evidence for a whole-genome duplication early during the evolution of ray-finned fishes. *Mol Biol Evol* 21, 1146–1151. <https://doi.org/10.1093/molbev/msh114>
- Chu, L., Li, J., Liu, Y., Cheng, C.H.K., 2015. Gonadotropin Signaling in Zebrafish Ovary and Testis Development: Insights From Gene Knockout Study. *Mol Endocrinol* 29, 1743–1758. <https://doi.org/10.1210/me.2015-1126>
- Chu, L., Li, J., Liu, Y., Hu, W., Cheng, C.H.K., 2014. Targeted gene disruption in zebrafish reveals noncanonical functions of LH signaling in reproduction. *Mol Endocrinol* 28, 1785–1795. <https://doi.org/10.1210/me.2014-1061>
- Ciereszko, A., Dietrich, M.A., Nynca, J., 2017. Fish semen proteomics — New opportunities in fish reproductive research. *Aquaculture, Recent advances in fish gametes and embryo research* 472, 81–92. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.03.005>
- Clark, A.M., Garland, K.K., Russell, L.D., 2000. Desert hedgehog (Dhh) gene is required in the mouse testis for formation of adult-type Leydig cells and normal development of peritubular cells and seminiferous tubules. *Biol Reprod* 63, 1825–1838. <https://doi.org/10.1095/biolreprod63.6.1825>
- Crespo, D., Assis, L.H.C., Furmanek, T., Bogerd, J., Schulz, R.W., 2016. Expression profiling identifies Sertoli and Leydig cell genes as Fsh targets in adult zebrafish testis. *Molecular and Cellular Endocrinology* 437, 237–251. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2016.08.033>
- Cuervo, A. m., Dice, J. f., 2000. Regulation of Lamp2a Levels in the Lysosomal Membrane. *Traffic* 1, 570–583. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0854.2000.010707.x>
- Cuervo, A.M., 2008. Autophagy and aging: keeping that old broom working. *Trends Genet* 24, 604–612. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2008.10.002>

- Cuervo, A.M., Dice, J.F., 2000. Unique properties of lamp2a compared to other lamp2 isoforms. *Journal of Cell Science* 113, 4441–4450. <https://doi.org/10.1242/jcs.113.24.4441>
- Cuervo, A.M., Dice, J.F., 1996. A receptor for the selective uptake and degradation of proteins by lysosomes. *Science* 273, 501–503. <https://doi.org/10.1126/science.273.5274.501>
- Cuervo, A.M., Knecht, E., Terlecky, S.R., Dice, J.F., 1995. Activation of a selective pathway of lysosomal proteolysis in rat liver by prolonged starvation. *Am J Physiol* 269, C1200–1208. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1995.269.5.C1200>
- Cuervo, A.M., Stefanis, L., Fredenburg, R., Lansbury, P.T., Sulzer, D., 2004. Impaired degradation of mutant alpha-synuclein by chaperone-mediated autophagy. *Science* 305, 1292–1295. <https://doi.org/10.1126/science.1101738>
- Cuervo, A.M., Terlecky, S.R., Dice, J.F., Knecht, E., 1994. Selective binding and uptake of ribonuclease A and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by isolated rat liver lysosomes. *Journal of Biological Chemistry* 269, 26374–26380. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)47204-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)47204-3)
- Cuervo, A.M., Wong, E., 2014. Chaperone-mediated autophagy: roles in disease and aging. *Cell Res* 24, 92–104. <https://doi.org/10.1038/cr.2013.153>
- de Rooij, D.G., 1973. Spermatogonial stem cell renewal in the mouse. I. Normal situation. *Cell Tissue Kinet* 6, 281–287. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.1973.tb01617.x>
- de Rooij, D.G., Griswold, M.D., 2012. Questions About Spermatogonia Posed and Answered Since 2000. *Journal of Andrology* 33, 1085–1095. <https://doi.org/10.2164/jandrol.112.016832>
- de Rooij, D.G., Russell, L.D., 2000. All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. *J Androl* 21, 776–798.
- Deretic, V., Levine, B., 2018. Autophagy balances inflammation in innate immunity. *Autophagy* 14, 243–251. <https://doi.org/10.1080/15548627.2017.1402992>
- Dice, J.F., 1990. Peptide sequences that target cytosolic proteins for lysosomal proteolysis. *Trends Biochem Sci* 15, 305–309. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(90\)90019-8](https://doi.org/10.1016/0968-0004(90)90019-8)
- Dice, J.F., Backer, J.M., Chiang, H.-L., Goff, S.A., 1987. Lysosomal degradation of microinjected proteins. *Biochemical Society Transactions* 15, 824–826. <https://doi.org/10.1042/bst0150824>
- DiNapoli, L., Capel, B., 2008. SRY and the standoff in sex determination. *Mol Endocrinol* 22, 1–9. <https://doi.org/10.1210/me.2007-0250>
- Ding, W.-X., Yin, X.-M., 2012. Mitophagy: mechanisms, pathophysiological roles, and analysis. *Biol Chem* 393, 547–564. <https://doi.org/10.1515/hsz-2012-0119>
- Dovere, L., Fera, S., Grasso, M., Lamberti, D., Gargioli, C., Muciaccia, B., Lustri, A.M., Stefanini, M., Vicini, E., 2013. The niche-derived glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) induces migration of mouse spermatogonial stem/progenitor cells. *PLoS One* 8, e59431. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059431>
- Early, J.J., Cole, K.L., Williamson, J.M., Swire, M., Kamadurai, H., Muskavitch, M., Lyons, D.A., 2018. An automated high-resolution in vivo screen in zebrafish to identify chemical regulators of myelination. *Elife* 7, e35136. <https://doi.org/10.7554/eLife.35136>
- Eguiara, A., Holgado, O., Beloqui, I., Abalde, L., Sanchez, Y., Callol, C., Martin, A.G., 2011. Xenografts in zebrafish embryos as a rapid functional assay for breast cancer stem-like cell identification. *Cell Cycle* 10, 3751–3757. <https://doi.org/10.4161/cc.10.21.17921>
- Elmonem, M.A., Khalil, R., Khodaparast, Ladan, Khodaparast, Laleh, Arcolino, F.O., Morgan, J., Pastore, A., Tylzanowski, P., Ny, A., Lowe, M., de Witte, P.A., Baelde, H.J., van den Heuvel, L.P., Levchenko, E., 2017. Cystinosis (ctns) zebrafish mutant shows

- pronephric glomerular and tubular dysfunction. *Sci Rep* 7, 42583. <https://doi.org/10.1038/srep42583>
- Erkkilä, K., Aito, H., Aalto, K., Pentikäinen, V., Dunkel, L., 2002. Lactate inhibits germ cell apoptosis in the human testis. *Mol Hum Reprod* 8, 109–117. <https://doi.org/10.1093/molehr/8.2.109>
- Ferreira, J.V., Fôfo, H., Bejarano, E., Bento, C.F., Ramalho, J.S., Girão, H., Pereira, P., 2013. STUB1/CHIP is required for HIF1A degradation by chaperone-mediated autophagy. *Autophagy* 9, 1349–1366. <https://doi.org/10.4161/auto.25190>
- Finn, P.F., Mesires, N.T., Vine, M., Dice, J.F., 2005. Effects of small molecules on chaperone-mediated autophagy. *Autophagy* 1, 141–145. <https://doi.org/10.4161/auto.1.3.2000>
- Fior, R., Póvoa, V., Mendes, R.V., Carvalho, T., Gomes, A., Figueiredo, N., Ferreira, M.G., 2017. Single-cell functional and chemosensitive profiling of combinatorial colorectal therapy in zebrafish xenografts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114, E8234–E8243. <https://doi.org/10.1073/pnas.1618389114>
- Folkman, J., 2007. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nat Rev Drug Discov* 6, 273–286. <https://doi.org/10.1038/nrd2115>
- França, L.R., Hess, R.A., Dufour, J.M., Hofmann, M.C., Griswold, M.D., 2016. The Sertoli cell: one hundred fifty years of beauty and plasticity. *Andrology* 4, 189–212. <https://doi.org/10.1111/andr.12165>
- Frydman, J., Höhfeld, J., 1997. Chaperones get in touch: the Hip-Hop connection. *Trends Biochem Sci* 22, 87–92. [https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(97\)01005-0](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(97)01005-0)
- Fuertes, G., Martín De Llano, J.J., Villarroya, A., Rivett, A.J., Knecht, E., 2003. Changes in the proteolytic activities of proteasomes and lysosomes in human fibroblasts produced by serum withdrawal, amino-acid deprivation and confluent conditions. *Biochem J* 375, 75–86. <https://doi.org/10.1042/BJ20030282>
- Fujimoto, T., Parton, R.G., 2011. Not just fat: the structure and function of the lipid droplet. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3, a004838. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004838>
- Gabellini, C., Gómez-Abenza, E., Ibáñez-Molero, S., Tupone, M.G., Pérez-Oliva, A.B., de Oliveira, S., Del Bufalo, D., Mulero, V., 2018. Interleukin 8 mediates bcl-xL-induced enhancement of human melanoma cell dissemination and angiogenesis in a zebrafish xenograft model. *Int J Cancer* 142, 584–596. <https://doi.org/10.1002/ijc.31075>
- Galardo, M.N., Riera, M.F., Pellizzari, E.H., Cigorraga, S.B., Meroni, S.B., 2007. The AMP-activated protein kinase activator, 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribose, regulates lactate production in rat Sertoli cells. *J Mol Endocrinol* 39, 279–288. <https://doi.org/10.1677/JME-07-0054>
- Gan, L., Vargas, M.R., Johnson, D.A., Johnson, J.A., 2012. Astrocyte-specific overexpression of Nrf2 delays motor pathology and synuclein aggregation throughout the CNS in the alpha-synuclein mutant (A53T) mouse model. *J Neurosci* 32, 17775–17787. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3049-12.2012>
- Gao, Fengyi, Li, G., Liu, C., Gao, H., Wang, H., Liu, W., Chen, M., Shang, Y., Wang, L., Shi, J., Xia, W., Jiao, J., Gao, Fei, Li, J., Chen, L., Li, W., 2018. Autophagy regulates testosterone synthesis by facilitating cholesterol uptake in Leydig cells. *J Cell Biol* 217, 2103–2119. <https://doi.org/10.1083/jcb.201710078>
- García-López, Á., de Jonge, H., Nóbrega, R.H., de Waal, P.P., van Dijk, W., Hemrika, W., Taranger, G.L., Bogerd, J., Schulz, R.W., 2010. Studies in Zebrafish Reveal Unusual Cellular Expression Patterns of Gonadotropin Receptor Messenger Ribonucleic Acids in the Testis and Unexpected Functional Differentiation of the Gonadotropins. *Endocrinology* 151, 2349–2360. <https://doi.org/10.1210/en.2009-1227>

- Gautier, A., Sohm, F., Joly, J.-S., Le Gac, F., Lareyre, J.-J., 2011. The Proximal Promoter Region of the Zebrafish *gsdf* Gene Is Sufficient to Mimic the Spatio-Temporal Expression Pattern of the Endogenous Gene in Sertoli and Granulosa Cells. *Biology of Reproduction* 85, 1240–1251. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.111.091892>
- Ghosh, R., Gillaspie, J.J., Campbell, K.S., Symons, J.D., Boudina, S., Pattison, J.S., 2022. Chaperone-mediated autophagy protects cardiomyocytes against hypoxic-cell death. *Am J Physiol Cell Physiol* 323, C1555–C1575. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00369.2021>
- Ghotra, V.P.S., He, S., de Bont, H., van der Ent, W., Spaink, H.P., van de Water, B., Snaar-Jagalska, B.E., Danen, E.H.J., 2012. Automated whole animal bio-imaging assay for human cancer dissemination. *PLoS One* 7, e31281. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031281>
- Ghotra, V.P.S., He, S., van der Horst, G., Nijhoff, S., de Bont, H., Lekkerkerker, A., Janssen, R., Jenster, G., van Leenders, G.J.L.H., Hoogland, A.M.M., Verhoef, E.I., Baranski, Z., Xiong, J., van de Water, B., van der Pluijm, G., Snaar-Jagalska, B.E., Danen, E.H.J., 2015. SYK is a candidate kinase target for the treatment of advanced prostate cancer. *Cancer Res* 75, 230–240. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-0629>
- Gomes, L.R., Menck, C.F.M., Cuervo, A.M., 2017. Chaperone-mediated autophagy prevents cellular transformation by regulating MYC proteasomal degradation. *Autophagy* 13, 928–940. <https://doi.org/10.1080/15548627.2017.1293767>
- Gómez, M., Manzano, A., Figueras, A., Viñals, F., Ventura, F., Rosa, J.L., Bartrons, R., Navarro-Sabaté, À., 2012. Sertoli-secreted FGF-2 induces PFKFB4 isozyme expression in mouse spermatogenic cells by activation of the MEK/ERK/CREB pathway. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 303, E695–707. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00381.2011>
- Gonzaga-Jauregui, C., Harel, T., Gambin, T., Kousi, M., Griffin, L.B., Francescato, L., Ozes, B., Karaca, E., Jhangiani, S.N., Bainbridge, M.N., Lawson, K.S., Pehlivan, D., Okamoto, Y., Withers, M., Mancias, P., Slavotinek, A., Reitnauer, P.J., Goksungur, M.T., Shy, M., Crawford, T.O., Koenig, M., Willer, J., Flores, B.N., Padiaditakis, I., Us, O., Wiszniewski, W., Parman, Y., Antonellis, A., Muzny, D.M., Baylor-Hopkins Center for Mendelian Genomics, Katsanis, N., Battaloglu, E., Boerwinkle, E., Gibbs, R.A., Lupski, J.R., 2015. Exome Sequence Analysis Suggests that Genetic Burden Contributes to Phenotypic Variability and Complex Neuropathy. *Cell Rep* 12, 1169–1183. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.07.023>
- Gough, N.R., Hatem, C.L., Fambrough, D.M., 1995. The family of LAMP-2 proteins arises by alternative splicing from a single gene: characterization of the avian LAMP-2 gene and identification of mammalian homologs of LAMP-2b and LAMP-2c. *DNA Cell Biol* 14, 863–867. <https://doi.org/10.1089/dna.1995.14.863>
- Greene, J.C., Whitworth, A.J., Kuo, I., Andrews, L.A., Feany, M.B., Pallanck, L.J., 2003. Mitochondrial pathology and apoptotic muscle degeneration in *Drosophila* parkin mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 4078–4083. <https://doi.org/10.1073/pnas.0737556100>
- Griswold, M.D., 1998. The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 9, 411–416. <https://doi.org/10.1006/scdb.1998.0203>
- Grootegoed, J.A., Oonk, R.B., Jansen, R., van der Molen, H.J., 1986. Metabolism of radiolabelled energy-yielding substrates by rat Sertoli cells. *J Reprod Fertil* 77, 109–118. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0770109>
- Gu, N.-H., Zhao, W.-L., Wang, G.-S., Sun, F., 2019. Comparative analysis of mammalian sperm ultrastructure reveals relationships between sperm morphology, mitochondrial functions and motility. *Reprod Biol Endocrinol* 17, 66. <https://doi.org/10.1186/s12958-019-0510-y>

- Guan, K., Nayernia, K., Maier, L.S., Wagner, S., Dressel, R., Lee, J.H., Nolte, J., Wolf, F., Li, M., Engel, W., Hasenfuss, G., 2006. Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis. *Nature* 440, 1199–1203. <https://doi.org/10.1038/nature04697>
- Haldi, M., Ton, C., Seng, W.L., McGrath, P., 2006. Human melanoma cells transplanted into zebrafish proliferate, migrate, produce melanin, form masses and stimulate angiogenesis in zebrafish. *Angiogenesis* 9, 139–151. <https://doi.org/10.1007/s10456-006-9040-2>
- Hales, K.G., Fuller, M.T., 1997. Developmentally regulated mitochondrial fusion mediated by a conserved, novel, predicted GTPase. *Cell* 90, 121–129. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80319-0](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80319-0)
- Harding, T.M., Morano, K.A., Scott, S.V., Klionsky, D.J., 1995. Isolation and characterization of yeast mutants in the cytoplasm to vacuole protein targeting pathway. *J Cell Biol* 131, 591–602. <https://doi.org/10.1083/jcb.131.3.591>
- Harter, C., Mellman, I., 1992. Transport of the lysosomal membrane glycoprotein Igpl20 (Igp-A) to lysosomes does not require appearance on the plasma membrane. *J Cell Biol* 117, 311–325. <https://doi.org/10.1083/jcb.117.2.311>
- Hasegawa, K., Saga, Y., 2012. Retinoic acid signaling in Sertoli cells regulates organization of the blood-testis barrier through cyclical changes in gene expression. *Development* 139, 4347–4355. <https://doi.org/10.1242/dev.080119>
- Hayashi, Y., Matsui, Y., 2022. Metabolic Control of Germline Formation and Differentiation in Mammals. *Sex Dev* 16, 388–403. <https://doi.org/10.1159/000520662>
- Herpin, A., Englberger, E., Zehner, M., Wacker, R., Gessler, M., Schartl, M., 2015. Defective autophagy through *epg5* mutation results in failure to reduce germ plasm and mitochondria. *FASEB J* 29, 4145–4161. <https://doi.org/10.1096/fj.14-265462>
- Herpin, A., Schartl, M., 2011. Sex determination: switch and suppress. *Curr Biol* 21, R656–659. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.07.026>
- Herzig, S., Shaw, R.J., 2018. AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 19, 121–135. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.95>
- Howe, K., Clark, M.D., Torroja, C.F., Torrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., Collins, J.E., Humphray, S., McLaren, K., Matthews, L., McLaren, S., Sealy, I., Caccamo, M., Churcher, C., Scott, C., Barrett, J.C., Koch, R., Rauch, G.-J., White, S., Chow, W., Kilian, B., Quintais, L.T., Guerra-Assunção, J.A., Zhou, Y., Gu, Y., Yen, J., Vogel, J.-H., Eyre, T., Redmond, S., Banerjee, R., Chi, J., Fu, B., Langley, E., Maguire, S.F., Laird, G.K., Lloyd, D., Kenyon, E., Donaldson, S., Sehra, H., Almeida-King, J., Loveland, J., Trevanion, S., Jones, M., Quail, M., Willey, D., Hunt, A., Burton, J., Sims, S., McLay, K., Plumb, B., Davis, J., Clee, C., Oliver, K., Clark, R., Riddle, C., Elliot, D., Threadgold, G., Harden, G., Ware, D., Begum, S., Mortimore, B., Kerry, G., Heath, P., Phillimore, B., Tracey, A., Corby, N., Dunn, M., Johnson, C., Wood, J., Clark, S., Pelan, S., Griffiths, G., Smith, M., Glithero, R., Howden, P., Barker, N., Lloyd, C., Stevens, C., Harley, J., Holt, K., Panagiotidis, G., Lovell, J., Beasley, H., Henderson, C., Gordon, D., Auger, K., Wright, D., Collins, J., Raisen, C., Dyer, L., Leung, K., Robertson, L., Ambridge, K., Leongamornlert, D., McGuire, S., Gilderthorp, R., Griffiths, C., Manthravadi, D., Nichol, S., Barker, G., Whitehead, S., Kay, M., Brown, J., Murnane, C., Gray, E., Humphries, M., Sycamore, N., Barker, D., Saunders, D., Wallis, J., Babbage, A., Hammond, S., Mashreghi-Mohammadi, M., Barr, L., Martin, S., Wray, P., Ellington, A., Matthews, N., Ellwood, M., Woodmansey, R., Clark, G., Cooper, J.D., Tromans, A., Grafham, D., Skuce, C., Pandian, R., Andrews, R., Harrison, E., Kimberley, A., Garnett, J., Fosker, N., Hall, R., Garner, P., Kelly, D., Bird, C., Palmer, S., Gehring, I., Berger, A., Dooley, C.M., Ersan-Ürün, Z., Eser, C., Geiger, H., Geisler, M., Karotki, L., Kirn, A., Konantz, J., Konantz, M., Oberländer, M., Rudolph-

- Geiger, S., Teucke, M., Lanz, C., Raddatz, G., Osoegawa, K., Zhu, B., Rapp, A., Widaa, S., Langford, C., Yang, F., Schuster, S.C., Carter, N.P., Harrow, J., Ning, Z., Herrero, J., Searle, S.M.J., Enright, A., Geisler, R., Plasterk, R.H.A., Lee, C., Westerfield, M., de Jong, P.J., Zon, L.I., Postlethwait, J.H., Nüsslein-Volhard, C., Hubbard, T.J.P., Roest Crolius, H., Rogers, J., Stemple, D.L., 2013. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* 496, 498–503. <https://doi.org/10.1038/nature12111>
- Huang, C.-C., Bose, J.K., Majumder, P., Lee, K.-H., Huang, J.-T.J., Huang, J.K., Shen, C.-K.J., 2014. Metabolism and mis-metabolism of the neuropathological signature protein TDP-43. *J Cell Sci* 127, 3024–3038. <https://doi.org/10.1242/jcs.136150>
- Huang, Q., Liu, Y., Zhang, S., Yap, Y.T., Li, W., Zhang, D., Gardner, A., Zhang, L., Song, S., Hess, R.A., Zhang, Z., 2021. Autophagy core protein ATG5 is required for elongating spermatid development, sperm individualization and normal fertility in male mice. *Autophagy* 17, 1753–1767. <https://doi.org/10.1080/15548627.2020.1783822>
- Huckins, C., 1971. The spermatogonial stem cell population in adult rats. I. Their morphology, proliferation and maturation. *Anat Rec* 169, 533–557. <https://doi.org/10.1002/ar.1091690306>
- Huhtaniemi, I.T., Themmen, A.P.N., 2005. Mutations in human gonadotropin and gonadotropin-receptor genes. *Endocrine* 26, 207–217. <https://doi.org/10.1385/ENDO:26:3:207>
- Huisken, J., Stainier, D.Y.R., 2009. Selective plane illumination microscopy techniques in developmental biology. *Development* 136, 1963–1975. <https://doi.org/10.1242/dev.022426>
- Hunziker, W., Harter, C., Matter, K., Mellman, I., 1991. Basolateral sorting in MDCK cells requires a distinct cytoplasmic domain determinant. *Cell* 66, 907–920. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90437-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90437-4)
- Ignatius, M.S., Hayes, M.N., Moore, F.E., Tang, Q., Garcia, S.P., Blackburn, P.R., Baxi, K., Wang, L., Jin, A., Ramakrishnan, A., Reeder, S., Chen, Y., Nielsen, G.P., Chen, E.Y., Hasserjian, R.P., Tirode, F., Ekker, S.C., Langenau, D.M., 2018. tp53 deficiency causes a wide tumor spectrum and increases embryonal rhabdomyosarcoma metastasis in zebrafish. *Elife* 7, e37202. <https://doi.org/10.7554/eLife.37202>
- Ikami, Y., Terasawa, K., Sakamoto, K., Ohtake, K., Harada, H., Watabe, T., Yokoyama, S., Hara-Yokoyama, M., 2022. The two-domain architecture of LAMP2A regulates its interaction with Hsc70. *Experimental Cell Research* 411, 112986. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2021.112986>
- Ikeuchi, T., Todo, T., Kobayashi, T., Nagahama, Y., 2001. Two subtypes of androgen and progesterone receptors in fish testes. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 129, 449–455. [https://doi.org/10.1016/s1096-4959\(01\)00375-x](https://doi.org/10.1016/s1096-4959(01)00375-x)
- Ishii, K., Kanatsu-Shinohara, M., Toyokuni, S., Shinohara, T., 2012. FGF2 mediates mouse spermatogonial stem cell self-renewal via upregulation of Etv5 and Bcl6b through MAP2K1 activation. *Development* 139, 1734–1743. <https://doi.org/10.1242/dev.076539>
- Ishikawa, T., 2017. Axoneme Structure from Motile Cilia. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 9, a028076. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028076>
- Iwamatsu, T., Yoshizaki, N., Shibata, Y., 1997. Changes in the chorion and sperm entry into the micropyle during fertilization in the teleostean fish, *Oryzias latipes*. *Dev Growth Differ* 39, 33–41. <https://doi.org/10.1046/j.1440-169x.1997.00005.x>
- Iyengar, S., Houvras, Y., Ceol, C.J., 2012. Screening for melanoma modifiers using a zebrafish autochthonous tumor model. *J Vis Exp* e50086. <https://doi.org/10.3791/50086>

- Jain, S., Gautam, V., Naseem, S., 2011. Acute-phase proteins: As diagnostic tool. *J Pharm Bioallied Sci* 3, 118–127. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.76489>
- Jalali, Z., Parvaz, N., 2020. Molecular evolution of autophagy rate-limiting factor LAMP2 in placental mammals. *Gene* 727, 144231. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2019.144231>
- Jameson, S.A., Natarajan, A., Cool, J., DeFalco, T., Maatouk, D.M., Mork, L., Munger, S.C., Capel, B., 2012. Temporal Transcriptional Profiling of Somatic and Germ Cells Reveals Biased Lineage Priming of Sexual Fate in the Fetal Mouse Gonad. *PLoS Genet* 8, e1002575. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002575>
- Janvier, K., Bonifacino, J.S., 2005. Role of the endocytic machinery in the sorting of lysosome-associated membrane proteins. *Mol Biol Cell* 16, 4231–4242. <https://doi.org/10.1091/mbc.e05-03-0213>
- Juste, Y.R., Kaushik, S., Bourdenx, M., Aflakpui, R., Bandyopadhyay, S., Garcia, F., Diaz, A., Lindenau, K., Tu, V., Krause, G.J., Jafari, M., Singh, R., Muñoz, J., Macian, F., Cuervo, A.M., 2021. Reciprocal regulation of chaperone-mediated autophagy and the circadian clock. *Nat Cell Biol* 23, 1255–1270. <https://doi.org/10.1038/s41556-021-00800-z>
- Jutte, N.H.P.M., Grootegoed, J.A., Rommerts, F.F.G., Van Der Molen, H.J., 1981. Exogenous lactate is essential for metabolic activities in isolated rat spermatocytes and spermatids. *Reproduction* 62, 399–405. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0620399>
- Kabuta, T., Furuta, A., Aoki, S., Furuta, K., Wada, K., 2008. Aberrant Interaction between Parkinson Disease-associated Mutant UCH-L1 and the Lysosomal Receptor for Chaperone-mediated Autophagy. *J Biol Chem* 283, 23731–23738. <https://doi.org/10.1074/jbc.M801918200>
- Kaur, G., Thompson, L.A., Dufour, J.M., 2014. Sertoli cells--immunological sentinels of spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 30, 36–44. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.02.011>
- Kaushik, S., Cuervo, A.M., 2018. The coming of age of chaperone-mediated autophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 19, 365–381. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0001-6>
- Kaushik, S., Cuervo, A.M., 2015. Degradation of lipid droplet-associated proteins by chaperone-mediated autophagy facilitates lipolysis. *Nat Cell Biol* 17, 759–770. <https://doi.org/10.1038/ncb3166>
- Kaushik, S., Juste, Y.R., Lindenau, K., Dong, S., Macho-González, A., Santiago-Fernández, O., McCabe, M., Singh, R., Gavathiotis, E., Cuervo, A.M., 2022. Chaperone-mediated autophagy regulates adipocyte differentiation. *Sci Adv* 8, eabq2733. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abq2733>
- Kerr, J.B., Mayberry, R.A., Irby, D.C., 1984. Morphometric studies on lipid inclusions in Sertoli cells during the spermatogenic cycle in the rat. *Cell Tissue Res* 236, 699–709. <https://doi.org/10.1007/BF00217241>
- Kiffin, R., Christian, C., Knecht, E., Cuervo, A.M., 2004. Activation of chaperone-mediated autophagy during oxidative stress. *Mol Biol Cell* 15, 4829–4840. <https://doi.org/10.1091/mbc.e04-06-0477>
- Kiffin, R., Kaushik, S., Zeng, M., Bandyopadhyay, U., Zhang, C., Massey, A.C., Martinez-Vicente, M., Cuervo, A.M., 2007. Altered dynamics of the lysosomal receptor for chaperone-mediated autophagy with age. *J Cell Sci* 120, 782–791. <https://doi.org/10.1242/jcs.001073>
- Kim, J.-H., Park, S.-J., Kim, T.-S., Kim, J.-M., Lee, D.-S., 2016. Testosterone production by a Leydig tumor cell line is suppressed by hyperthermia-induced endoplasmic reticulum stress in mice. *Life Sci* 146, 184–191. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2015.12.042>
- Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B., Schilling, T.F., 1995. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn* 203, 253–310. <https://doi.org/10.1002/aja.1002030302>

- Kirat, D., Alahwany, A.M., Arisha, A.H., Abdelkhalek, A., Miyasho, T., 2023. Role of Macroautophagy in Mammalian Male Reproductive Physiology. *Cells* 12, 1322. <https://doi.org/10.3390/cells12091322>
- Kirchner, P., Bourdenx, M., Madrigal-Matute, J., Tiano, S., Diaz, A., Bartholdy, B.A., Will, B., Cuervo, A.M., 2019. Proteome-wide analysis of chaperone-mediated autophagy targeting motifs. *PLoS Biol* 17. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000301>
- Kissová, I., Salin, B., Schaeffer, J., Bhatia, S., Manon, S., Camougrand, N., 2007. Selective and non-selective autophagic degradation of mitochondria in yeast. *Autophagy* 3, 329–336. <https://doi.org/10.4161/auto.4034>
- Koga, H., Martinez-Vicente, M., Arias, E., Kaushik, S., Sulzer, D., Cuervo, A.M., 2011a. Constitutive Upregulation of Chaperone-Mediated Autophagy in Huntington's Disease. *J Neurosci* 31, 18492–18505. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3219-11.2011>
- Koga, H., Martinez-Vicente, M., Macian, F., Verkhusha, V.V., Cuervo, A.M., 2011b. A photoconvertible fluorescent reporter to track chaperone-mediated autophagy. *Nat Commun* 2, 386. <https://doi.org/10.1038/ncomms1393>
- Kon, M., Kiffin, R., Koga, H., Chaochnick, J., Macian, F., Varticovski, L., Cuervo, A.M., 2011. Chaperone-mediated autophagy is required for tumor growth. *Sci Transl Med* 3, 109ra117. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003182>
- Koppers, A.J., De Iuliis, G.N., Finnie, J.M., McLaughlin, E.A., Aitken, R.J., 2008. Significance of mitochondrial reactive oxygen species in the generation of oxidative stress in spermatozoa. *J Clin Endocrinol Metab* 93, 3199–3207. <https://doi.org/10.1210/jc.2007-2616>
- Lam, S.H., Chua, H.L., Gong, Z., Lam, T.J., Sin, Y.M., 2004. Development and maturation of the immune system in zebrafish, *Danio rerio*: a gene expression profiling, in situ hybridization and immunological study. *Dev Comp Immunol* 28, 9–28. [https://doi.org/10.1016/s0145-305x\(03\)00103-4](https://doi.org/10.1016/s0145-305x(03)00103-4)
- Lam, S.H., Lee, S.G.P., Lin, C.Y., Thomsen, J.S., Fu, P.Y., Murthy, K.R.K., Li, H., Govindarajan, K.R., Nick, L.C.H., Bourque, G., Gong, Z., Lufkin, T., Liu, E.T., Mathavan, S., 2011. Molecular conservation of estrogen-response associated with cell cycle regulation, hormonal carcinogenesis and cancer in zebrafish and human cancer cell lines. *BMC Med Genomics* 4, 41. <https://doi.org/10.1186/1755-8794-4-41>
- Le Gac, F.L.G., Lareyre, J.-J., Montfort, J., Esquerre, D., Houlgatte, R., 2008. Transcriptional analysis of spermatogenesis regulation by sex steroids in trout. <https://doi.org/10.26028/CYBIUM/2008-322SP-051>
- Leal, M.C., Cardoso, E.R., Nóbrega, R.H., Batlouni, S.R., Bogerd, J., França, L.R., Schulz, R.W., 2009. Histological and Stereological Evaluation of Zebrafish (*Danio rerio*) Spermatogenesis with an Emphasis on Spermatogonial Generations1. *Biology of Reproduction* 81, 177–187. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.076299>
- Lee, J., Richburg, J.H., Younkin, S.C., Boekelheide, K., 1997. The Fas system is a key regulator of germ cell apoptosis in the testis. *Endocrinology* 138, 2081–2088. <https://doi.org/10.1210/endo.138.5.5110>
- Lee, L.M.J., Seftor, E.A., Bonde, G., Cornell, R.A., Hendrix, M.J.C., 2005. The fate of human malignant melanoma cells transplanted into zebrafish embryos: assessment of migration and cell division in the absence of tumor formation. *Dev Dyn* 233, 1560–1570. <https://doi.org/10.1002/dvdy.20471>
- Lescat, L., Herpin, A., Mourot, B., Véron, V., Guiguen, Y., Bobe, J., Seiliez, I., 2018. CMA restricted to mammals and birds: myth or reality? *Autophagy* 14, 1267–1270. <https://doi.org/10.1080/15548627.2018.1460021>
- Lescat, L., Véron, V., Mourot, B., Péron, S., Chenais, N., Dias, K., Riera-Heredia, N., Beaumatin, F., Pinel, K., Priault, M., Panserat, S., Salin, B., Guiguen, Y., Bobe, J.,

- Herpin, A., Seiliez, I., 2020. Chaperone-Mediated Autophagy in the Light of Evolution: Insight from Fish. *Mol Biol Evol* 37, 2887–2899. <https://doi.org/10.1093/molbev/msaa127>
- Leung, K.F., Dacks, J.B., Field, M.C., 2008. Evolution of the multivesicular body ESCRT machinery; retention across the eukaryotic lineage. *Traffic* 9, 1698–1716. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2008.00797.x>
- Li, Le, Chen, H., Gao, Y., Wang, Y.-W., Zhang, G.-Q., Pan, S.-H., Ji, L., Kong, R., Wang, G., Jia, Y.-H., Bai, X.-W., Sun, B., 2016. Long Noncoding RNA MALAT1 Promotes Aggressive Pancreatic Cancer Proliferation and Metastasis via the Stimulation of Autophagy. *Mol Cancer Ther* 15, 2232–2243. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-16-0008>
- Li, L., Fang, R., Liu, B., Shi, H., Wang, Y., Zhang, W., Zhang, X., Ye, L., 2016. Deacetylation of tumor-suppressor MST1 in Hippo pathway induces its degradation through HBXIP-elevated HDAC6 in promotion of breast cancer growth. *Oncogene* 35, 4048–4057. <https://doi.org/10.1038/onc.2015.476>
- Li, N., Tang, E.I., Cheng, C.Y., 2016. Regulation of blood-testis barrier by actin binding proteins and protein kinases. *Reproduction* 151, R29–41. <https://doi.org/10.1530/REP-15-0463>
- Li, W., Zhu, J., Dou, J., She, H., Tao, K., Xu, H., Yang, Q., Mao, Z., 2017. Phosphorylation of LAMP2A by p38 MAPK couples ER stress to chaperone-mediated autophagy. *Nat Commun* 8, 1763. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01609-x>
- Lien, S., Koop, B.F., Sandve, S.R., Miller, J.R., Kent, M.P., Nome, T., Hvidsten, T.R., Leong, J.S., Minkley, D.R., Zimin, A., Grammes, F., Grove, H., Gjuvsland, A., Walenz, B., Hermansen, R.A., von Schalburg, K., Rondeau, E.B., Di Genova, A., Samy, J.K.A., Olav Vik, J., Vigeland, M.D., Caler, L., Grimholt, U., Jentoft, S., Våge, D.I., de Jong, P., Moen, T., Baranski, M., Palti, Y., Smith, D.R., Yorke, J.A., Nederbragt, A.J., Tooming-Klunderud, A., Jakobsen, K.S., Jiang, X., Fan, D., Hu, Y., Liberles, D.A., Vidal, R., Iturra, P., Jones, S.J.M., Jonassen, I., Maass, A., Omholt, S.W., Davidson, W.S., 2016. The Atlantic salmon genome provides insights into rediploidization. *Nature* 533, 200–205. <https://doi.org/10.1038/nature17164>
- Liu, C., Sun, W., Zhu, T., Shi, S., Zhang, Jieping, Wang, J., Gao, F., Ou, Q., Jin, C., Li, J., Xu, J.-Y., Zhang, Jingfa, Tian, H., Xu, G.-T., Lu, L., 2022. Glia maturation factor- β induces ferroptosis by impairing chaperone-mediated autophagic degradation of ACSL4 in early diabetic retinopathy. *Redox Biol* 52, 102292. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2022.102292>
- Liu, C., Wang, H., Shang, Y., Liu, W., Song, Z., Zhao, H., Wang, L., Jia, P., Gao, Fengyi, Xu, Z., Yang, L., Gao, Fei, Li, W., 2016. Autophagy is required for ectoplasmic specialization assembly in sertoli cells. *Autophagy* 12, 814–832. <https://doi.org/10.1080/15548627.2016.1159377>
- Liu, Q., Gao, H., Yang, F., Zhang, H., Zeng, S., 2021. FSH Promotes Progesterone Synthesis by Enhancing Autophagy to Accelerate Lipid Droplet Degradation in Porcine Granulosa Cells. *Front Cell Dev Biol* 9, 626927. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.626927>
- Loir, M., 1999. Spermatogonia of rainbow trout: I. morphological characterization, mitotic activity, and survival in primary cultures of testicular cells. *Molecular Reproduction and Development* 53, 422–433. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(199908\)53:4<422::AID-MRD8>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199908)53:4<422::AID-MRD8>3.0.CO;2-V)
- Lv, L., Li, D., Zhao, D., Lin, R., Chu, Y., Zhang, H., Zha, Z., Liu, Y., Li, Z., Xu, Y., Wang, G., Huang, Y., Xiong, Y., Guan, K.-L., Lei, Q.-Y., 2011. Acetylation Targets the M2 Isoform of Pyruvate Kinase for Degradation through Chaperone-Mediated Autophagy

- and Promotes Tumor Growth. *Mol Cell* 42, 719–730. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.04.025>
- Ma, S.Y., Sun, K.S., Zhang, M., Zhou, X., Zheng, X.H., Tian, S.Y., Liu, Y.S., Chen, L., Gao, X., Ye, J., Zhou, X.M., Wang, J.B., Han, Y., 2020. Disruption of Plin5 degradation by CMA causes lipid homeostasis imbalance in NAFLD. *Liver Int* 40, 2427–2438. <https://doi.org/10.1111/liv.14492>
- Ma, Y., Zhou, Y., Zhu, Y.-C., Wang, S.-Q., Ping, P., Chen, X.-F., 2018. Lipophagy Contributes to Testosterone Biosynthesis in Male Rat Leydig Cells. *Endocrinology* 159, 1119–1129. <https://doi.org/10.1210/en.2017-03020>
- Macqueen, D.J., Johnston, I.A., 2014. A well-constrained estimate for the timing of the salmonid whole genome duplication reveals major decoupling from species diversification. *Proc Biol Sci* 281, 20132881. <https://doi.org/10.1098/rspb.2013.2881>
- Madrigal-Matute, J., Cuervo, A.M., Sluimer, J.C., 2022. Chaperone-mediated autophagy protects against atherosclerosis. *Autophagy* 18, 2505–2507. <https://doi.org/10.1080/15548627.2022.2096397>
- Mak, S.K., McCormack, A.L., Manning-Bog, A.B., Cuervo, A.M., Di Monte, D.A., 2010. Lysosomal degradation of alpha-synuclein in vivo. *J Biol Chem* 285, 13621–13629. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.074617>
- Malkus, K.A., Ischiropoulos, H., 2012. Regional deficiencies in chaperone-mediated autophagy underlie α -synuclein aggregation and neurodegeneration. *Neurobiol Dis* 46, 732–744. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2012.03.017>
- Mallea, L.E., Machado, A.J., Navaroli, F., Rommerts, F.F., 1986. Epidermal growth factor stimulates lactate production and inhibits aromatization in cultured Sertoli cells from immature rats. *Int J Androl* 9, 201–208. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.1986.tb00883.x>
- Mandal, A., Pinter, K., Drerup, C.M., 2018. Analyzing Neuronal Mitochondria in vivo Using Fluorescent Reporters in Zebrafish. *Front Cell Dev Biol* 6, 144. <https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00144>
- Mandl, J., Mészáros, T., Bánhegyi, G., Csala, M., 2013. Minireview: Endoplasmic Reticulum Stress: Control in Protein, Lipid, and Signal Homeostasis. *Mol Endocrinol* 27, 384–393. <https://doi.org/10.1210/me.2012-1317>
- Martin, L.J., 2016. Cell interactions and genetic regulation that contribute to testicular Leydig cell development and differentiation. *Mol Reprod Dev* 83, 470–487. <https://doi.org/10.1002/mrd.22648>
- Martinez-Vicente, M., Tallozy, Z., Kaushik, S., Massey, A.C., Mazzulli, J., Mosharov, E.V., Hodara, R., Fredenburg, R., Wu, D.-C., Follenzi, A., Dauer, W., Przedborski, S., Ischiropoulos, H., Lansbury, P.T., Sulzer, D., Cuervo, A.M., 2008. Dopamine-modified α -synuclein blocks chaperone-mediated autophagy. *The Journal of Clinical Investigation* 118, 777. <https://doi.org/10.1172/JCI32806>
- Martin-Hidalgo, D., Hurtado de Llera, A., Calle-Guisado, V., Gonzalez-Fernandez, L., Garcia-Marin, L., Bragado, M.J., 2018. AMPK Function in Mammalian Spermatozoa. *Int J Mol Sci* 19, 3293. <https://doi.org/10.3390/ijms19113293>
- Masaki, K., Sakai, M., Kuroki, S., Jo, J.-I., Hoshina, K., Fujimori, Y., Oka, K., Amano, T., Yamanaka, T., Tachibana, M., Tabata, Y., Shiozawa, T., Ishizuka, O., Hochi, S., Takashima, S., 2018. FGF2 Has Distinct Molecular Functions from GDNF in the Mouse Germline Niche. *Stem Cell Reports* 10, 1782–1792. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2018.03.016>
- Mathias, J.R., Saxena, M.T., Mumm, J.S., 2012. Advances in zebrafish chemical screening technologies. *Future Med Chem* 4, 1811–1822. <https://doi.org/10.4155/fmc.12.115>

- Matson, C.K., Murphy, M.W., Sarver, A.L., Griswold, M.D., Bardwell, V.J., Zarkower, D., 2011. DMRT1 prevents female reprogramming in the postnatal mammalian testis. *Nature* 476, 101–104. <https://doi.org/10.1038/nature10239>
- Matsuhara, H., Yamamoto, A., 2016. Autophagy is required for efficient meiosis progression and proper meiotic chromosome segregation in fission yeast. *Genes Cells* 21, 65–87. <https://doi.org/10.1111/gtc.12320>
- McCabe, M.J., Foo, C.F., Dinger, M.E., Smooker, P.M., Stanton, P.G., 2016. Claudin-11 and occludin are major contributors to Sertoli cell tight junction function, in vitro. *Asian J Androl* 18, 620–626. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.163189>
- McLachlan, R.I., O'Donnell, L., Stanton, P.G., Balourdos, G., Frydenberg, M., de Kretser, D.M., Robertson, D.M., 2002. Effects of testosterone plus medroxyprogesterone acetate on semen quality, reproductive hormones, and germ cell populations in normal young men. *J Clin Endocrinol Metab* 87, 546–556. <https://doi.org/10.1210/jcem.87.2.8231>
- McLaren, A., 2003. Primordial germ cells in the mouse. *Dev Biol* 262, 1–15. [https://doi.org/10.1016/s0012-1606\(03\)00214-8](https://doi.org/10.1016/s0012-1606(03)00214-8)
- Meinhardt, A., McFarlane, J.R., Seitz, J., de Kretser, D.M., 2000. Activin maintains the condensed type of mitochondria in germ cells. *Mol Cell Endocrinol* 168, 111–117. [https://doi.org/10.1016/s0303-7207\(00\)00308-7](https://doi.org/10.1016/s0303-7207(00)00308-7)
- Merlet, J., Racine, C., Moreau, E., Moreno, S.G., Habert, R., 2007. Male fetal germ cells are targets for androgens that physiologically inhibit their proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 3615–3620. <https://doi.org/10.1073/pnas.0611421104>
- Meroni, S.B., Riera, M.F., Pellizzari, E.H., Cigorraga, S.B., 2002. Regulation of rat Sertoli cell function by FSH: possible role of phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway. *J Endocrinol* 174, 195–204. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1740195>
- Mijaljica, D., Prescott, M., Devenish, R.J., 2011. Microautophagy in mammalian cells: Revisiting a 40-year-old conundrum. *Autophagy* 7, 673–682. <https://doi.org/10.4161/auto.7.7.14733>
- Miller, W.P., Toro, A.L., Sunilkumar, S., Stevens, S.A., VanCleave, A.M., Williamson, D.L., Barber, A.J., Dennis, M.D., 2022. Müller Glial Expression of REDD1 Is Required for Retinal Neurodegeneration and Visual Dysfunction in Diabetic Mice. *Diabetes* 71, 1051–1062. <https://doi.org/10.2337/db21-0853>
- Mital, P., Hinton, B.T., Dufour, J.M., 2011. The blood-testis and blood-epididymis barriers are more than just their tight junctions. *Biol Reprod* 84, 851–858. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.110.087452>
- Miura, C., Kuwahara, R., Miura, T., 2007. Transfer of spermatogenesis-related cDNAs into eel testis germ-somatic cell coculture pellets by electroporation: methods for analysis of gene function. *Mol Reprod Dev* 74, 420–427. <https://doi.org/10.1002/mrd.20653>
- Miura, T., Miura, C., Ohta, T., Nader, M.R., Todo, T., Yamauchi, K., 1999. Estradiol-17beta stimulates the renewal of spermatogonial stem cells in males. *Biochem Biophys Res Commun* 264, 230–234. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.1494>
- Miura, T., Yamauchi, K., Takahashi, H., Nagahama, Y., 1991. Hormonal induction of all stages of spermatogenesis in vitro in the male Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 5774–5778. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.13.5774>
- Morais, R.D.V.S., Nóbrega, R.H., Gómez-González, N.E., Schmidt, R., Bogerd, J., França, L.R., Schulz, R.W., 2013. Thyroid hormone stimulates the proliferation of Sertoli cells and single type A spermatogonia in adult zebrafish (*Danio rerio*) testis. *Endocrinology* 154, 4365–4376. <https://doi.org/10.1210/en.2013-1308>
- Münz, C., 2017. The Autophagic Machinery in Viral Exocytosis. *Front Microbiol* 8, 269. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00269>

- Münz, C., 2011. Macroautophagy during Innate Immune Activation. *Front Microbiol* 2, 72. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00072>
- Murat, F., Mbengue, N., Winge, S.B., Trefzer, T., Leushkin, E., Sepp, M., Cardoso-Moreira, M., Schmidt, J., Schneider, C., Mößinger, K., Brüning, T., Lamanna, F., Belles, M.R., Conrad, C., Kondova, I., Bontrop, R., Behr, R., Khaitovich, P., Pääbo, S., Marques-Bonet, T., Grützner, F., Almstrup, K., Schierup, M.H., Kaessmann, H., 2023. The molecular evolution of spermatogenesis across mammals. *Nature* 613, 308–316. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-05547-7>
- Nakamura, M., Okinaga, S., Arai, K., 1984. Metabolism of pachytene primary spermatocytes from rat testes: pyruvate maintenance of adenosine triphosphate level. *Biol Reprod* 30, 1187–1197. <https://doi.org/10.1095/biolreprod30.5.1187>
- Nakanishi, Y., Shiratsuchi, A., 2004. Phagocytic removal of apoptotic spermatogenic cells by Sertoli cells: mechanisms and consequences. *Biol Pharm Bull* 27, 13–16. <https://doi.org/10.1248/bpb.27.13>
- Napolitano, G., Johnson, J., He, J., Rocca, C., Monfregola, J., Pestonjamas, K., Cherqui, S., Catz, S., 2015. Impairment of chaperone-mediated autophagy leads to selective lysosomal degradation defects in the lysosomal storage disease cystinosis. *EMBO Molecular Medicine* 7. <https://doi.org/10.15252/emmm.201404223>
- Nasevicius, A., Ekker, S.C., 2000. Effective targeted gene “knockdown” in zebrafish. *Nat Genet* 26, 216–220. <https://doi.org/10.1038/79951>
- Nguyen, T.N., Padman, B.S., Lazarou, M., 2016. Deciphering the Molecular Signals of PINK1/Parkin Mitophagy. *Trends Cell Biol* 26, 733–744. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.05.008>
- Nicholls, P.K., Harrison, C.A., Rainczuk, K.E., Wayne Vogl, A., Stanton, P.G., 2013. Retinoic acid promotes Sertoli cell differentiation and antagonises activin-induced proliferation. *Mol Cell Endocrinol* 377, 33–43. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2013.06.034>
- Nicoli, S., Presta, M., 2007. The zebrafish/tumor xenograft angiogenesis assay. *Nat Protoc* 2, 2918–2923. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.412>
- Nóbrega, R.H., Morais, R.D.V. de S., Crespo, D., de Waal, P.P., de França, L.R., Schulz, R.W., Bogerd, J., 2015. Fsh Stimulates Spermatogonial Proliferation and Differentiation in Zebrafish via Igf3. *Endocrinology* 156, 3804–3817. <https://doi.org/10.1210/en.2015-1157>
- Nowicka-Bauer, K., Nixon, B., 2020. Molecular Changes Induced by Oxidative Stress that Impair Human Sperm Motility. *Antioxidants (Basel)* 9, 134. <https://doi.org/10.3390/antiox9020134>
- Nunnari, J., Suomalainen, A., 2012. Mitochondria: in sickness and in health. *Cell* 148, 1145–1159. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.035>
- Oakberg, E.F., 1971. Spermatogonial stem-cell renewal in the mouse. *Anat Rec* 169, 515–531. <https://doi.org/10.1002/ar.1091690305>
- O’Donnell, L., Nicholls, P.K., O’Byrne, M.K., McLachlan, R.I., Stanton, P.G., 2011. Spermiation. *Spermatogenesis* 1, 14–35. <https://doi.org/10.4161/spmg.1.1.14525>
- Ohta, T., Iwamatsu, T., 1983. Electron microscopic observations on sperm entry into eggs of the rose bitterling, *Rhodeus ocellatus*. *J Exp Zool* 227, 109–119. <https://doi.org/10.1002/jez.1402270115>
- Ohta, T., Miyake, H., Miura, C., Kamei, H., Aida, K., Miura, T., 2007. Follicle-stimulating hormone induces spermatogenesis mediated by androgen production in Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Biol Reprod* 77, 970–977. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.107.062299>
- Oliveira, P.F., Alves, M.G., Rato, L., Laurentino, S., Silva, J., Sá, R., Barros, A., Sousa, M., Carvalho, R.A., Cavaco, J.E., Socorro, S., 2012. Effect of insulin deprivation on

- metabolism and metabolism-associated gene transcript levels of in vitro cultured human Sertoli cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1820, 84–89. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.11.006>
- Oliveira, P.F., Alves, M.G., Rato, L., Silva, J., Sá, R., Barros, A., Sousa, M., Carvalho, R.A., Cavaco, J.E., Socorro, S., 2011. Influence of 5 α -dihydrotestosterone and 17 β -estradiol on human Sertoli cells metabolism. *Int J Androl* 34, e612-620. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2011.01205.x>
- Olzmann, J.A., Kopito, R.R., Christianson, J.C., 2013. The mammalian endoplasmic reticulum-associated degradation system. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5, a013185. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a013185>
- Omura, T., Siekevitz, P., Palade, G.E., 1967. Turnover of constituents of the endoplasmic reticulum membranes of rat hepatocytes. *J Biol Chem* 242, 2389–2396.
- Onal, G., Kutlu, O., Gozuacik, D., Dokmeci Emre, S., 2017. Lipid Droplets in Health and Disease. *Lipids Health Dis* 16, 128. <https://doi.org/10.1186/s12944-017-0521-7>
- Oonk, R.B., Jansen, R., Grootegoed, J.A., 1989. Differential effects of follicle-stimulating hormone, insulin, and insulin-like growth factor I on hexose uptake and lactate production by rat Sertoli cells. *Journal of Cellular Physiology* 139, 210–218. <https://doi.org/10.1002/jcp.1041390128>
- Orenstein, S.J., Kuo, S.-H., Tasset, I., Arias, E., Koga, H., Fernandez-Carasa, I., Cortes, E., Honig, L.S., Dauer, W., Consiglio, A., Raya, A., Sulzer, D., Cuervo, A.M., 2013. Interplay of LRRK2 with chaperone-mediated autophagy. *Nat Neurosci* 16, 394–406. <https://doi.org/10.1038/nn.3350>
- O’Shaughnessy, P.J., Baker, P.J., Heikkilä, M., Vainio, S., McMahon, A.P., 2000. Localization of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase/17-ketosteroid reductase isoform expression in the developing mouse testis--androstenedione is the major androgen secreted by fetal/neonatal leydig cells. *Endocrinology* 141, 2631–2637. <https://doi.org/10.1210/endo.141.7.7545>
- Pajares, M., Rojo, A.I., Arias, E., Díaz-Carretero, A., Cuervo, A.M., Cuadrado, A., 2018. Transcription factor NFE2L2/NRF2 modulates chaperone-mediated autophagy through the regulation of LAMP2A. *Autophagy* 14, 1310–1322. <https://doi.org/10.1080/15548627.2018.1474992>
- Parichy, D.M., 2015. Advancing biology through a deeper understanding of zebrafish ecology and evolution. *Elife* 4, e05635. <https://doi.org/10.7554/eLife.05635>
- Park, C., Suh, Y., Cuervo, A.M., 2015. Regulated Degradation of Chk1 by chaperone-mediated autophagy in response to DNA damage. *Nat Commun* 6, 6823. <https://doi.org/10.1038/ncomms7823>
- Park, J.-S., Kim, D.-H., Yoon, S.-Y., 2016. Regulation of amyloid precursor protein processing by its KFERQ motif. *BMB Rep* 49, 337–342. <https://doi.org/10.5483/bmbrep.2016.49.6.212>
- Park, S., Choi, S.-G., Yoo, S.-M., Nah, J., Jeong, E., Kim, H., Jung, Y.-K., 2015. Pyruvate stimulates mitophagy via PINK1 stabilization. *Cell Signal* 27, 1824–1830. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2015.05.020>
- Pradhan, A., Olsson, P.-E., 2015. Inhibition of retinoic acid synthesis disrupts spermatogenesis and fecundity in zebrafish. *General and Comparative Endocrinology* 217–218, 81–91. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2015.02.002>
- Prajsnar, T.K., McVicker, G., Williams, A., Renshaw, S.A., Foster, S.J., 2018. Use of Larval Zebrafish Model to Study Within-Host Infection Dynamics. *Methods Mol Biol* 1736, 147–156. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7638-6_14

- Prince, F.P., 2002. Lamellar and tubular associations of the mitochondrial cristae: unique forms of the cristae present in steroid-producing cells. *Mitochondrion* 1, 381–389. [https://doi.org/10.1016/s1567-7249\(01\)00038-1](https://doi.org/10.1016/s1567-7249(01)00038-1)
- Pudney, J., 1995. Spermatogenesis in nonmammalian vertebrates. *Microsc Res Tech* 32, 459–497. <https://doi.org/10.1002/jemt.1070320602>
- Qi, L., Zhang, X.-D., Wu, J.-C., Lin, F., Wang, J., DiFiglia, M., Qin, Z.-H., 2012. The role of chaperone-mediated autophagy in huntingtin degradation. *PLoS One* 7, e46834. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046834>
- Qi, Z., Chen, L., 2019. Endoplasmic Reticulum Stress and Autophagy. *Adv Exp Med Biol* 1206, 167–177. https://doi.org/10.1007/978-981-15-0602-4_8
- Qiao, L., Ma, J., Zhang, Z., Sui, W., Zhai, C., Xu, D., Wang, Z., Lu, H., Zhang, M., Zhang, C., Chen, W., Zhang, Y., 2021. Deficient Chaperone-Mediated Autophagy Promotes Inflammation and Atherosclerosis. *Circ Res* 129, 1141–1157. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.121.318908>
- Quintavalle, C., Di Costanzo, S., Zanca, C., Tasset, I., Fraldi, A., Incoronato, M., Mirabelli, P., Monti, M., Ballabio, A., Pucci, P., Cuervo, A.M., Condorelli, G., 2014. Phosphorylation-regulated degradation of the tumor-suppressor form of PED by chaperone-mediated autophagy in lung cancer cells. *J Cell Physiol* 229, 1359–1368. <https://doi.org/10.1002/jcp.24569>
- Rato, L., Alves, M.G., Socorro, S., Duarte, A.I., Cavaco, J.E., Oliveira, P.F., 2012. Metabolic regulation is important for spermatogenesis. *Nat Rev Urol* 9, 330–338. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2012.77>
- Rato, L., Meneses, M.J., Silva, B., Sousa, M., Alves, M., Oliveira, P., 2015. New insights on hormones and factors that modulate Sertoli cell metabolism. *Histology and histopathology* 31, 11717. <https://doi.org/10.14670/HH-11-717>
- Rebourcet, D., Monteiro, A., Cruickshanks, L., Jeffery, N., Smith, S., Milne, L., O’Shaughnessy, P.J., Smith, L.B., 2019. Relationship of transcriptional markers to Leydig cell number in the mouse testis. *PLoS One* 14, e0219524. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219524>
- Rebourcet, D., O’Shaughnessy, P.J., Monteiro, A., Milne, L., Cruickshanks, L., Jeffrey, N., Guillou, F., Freeman, T.C., Mitchell, R.T., Smith, L.B., 2014a. Sertoli cells maintain Leydig cell number and peritubular myoid cell activity in the adult mouse testis. *PLoS One* 9, e105687. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105687>
- Rebourcet, D., O’Shaughnessy, P.J., Pitetti, J.-L., Monteiro, A., O’Hara, L., Milne, L., Tsai, Y.T., Cruickshanks, L., Riethmacher, D., Guillou, F., Mitchell, R.T., van ’t Hof, R., Freeman, T.C., Nef, S., Smith, L.B., 2014b. Sertoli cells control peritubular myoid cell fate and support adult Leydig cell development in the prepubertal testis. *Development* 141, 2139–2149. <https://doi.org/10.1242/dev.107029>
- Regueira, M., Artagaveytia, S.L., Galardo, M.N., Pellizzari, E.H., Cigorraga, S.B., Meroni, S.B., Riera, M.F., 2015. Novel molecular mechanisms involved in hormonal regulation of lactate production in Sertoli cells. *Reproduction* 150, 311–321. <https://doi.org/10.1530/REP-15-0093>
- Retterstøl, K., Haugen, T.B., Tran, T.N., Christophersen, B.O., 2001. Studies on the metabolism of essential fatty acids in isolated human testicular cells. *Reproduction* 121, 881–887. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1210881>
- Riera, M.F., Meroni, S.B., Gómez, G.E., Schteingart, H.F., Pellizzari, E.H., Cigorraga, S.B., 2001. Regulation of Lactate Production by FSH, IL1 β , and TNF α in Rat Sertoli Cells. *General and Comparative Endocrinology* 122, 88–97. <https://doi.org/10.1006/gcen.2001.7619>

- Robinson, R., Fritz, I.B., 1981. Metabolism of glucose by Sertoli cells in culture. *Biol Reprod* 24, 1032–1041. <https://doi.org/10.1095/biolreprod24.5.1032>
- Roel, M., Rubiolo, J.A., Guerra-Varela, J., Silva, S.B.L., Thomas, O.P., Cabezas-Sainz, P., Sánchez, L., López, R., Botana, L.M., 2016. Marine guanidine alkaloids crambescidins inhibit tumor growth and activate intrinsic apoptotic signaling inducing tumor regression in a colorectal carcinoma zebrafish xenograft model. *Oncotarget* 7, 83071–83087. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.13068>
- Rotgers, E., Jørgensen, A., Yao, H.H.-C., 2018. At the Crossroads of Fate—Somatic Cell Lineage Specification in the Fetal Gonad. *Endocr Rev* 39, 739–759. <https://doi.org/10.1210/er.2018-00010>
- Rout, A.K., Strub, M.-P., Piszczek, G., Tjandra, N., 2014. Structure of Transmembrane Domain of Lysosome-associated Membrane Protein Type 2a (LAMP-2A) Reveals Key Features for Substrate Specificity in Chaperone-mediated Autophagy. *Journal of Biological Chemistry* 289, 35111–35123. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.609446>
- Rubin, C.I., Atweh, G.F., 2004. The role of stathmin in the regulation of the cell cycle. *J Cell Biochem* 93, 242–250. <https://doi.org/10.1002/jcb.20187>
- Ruiz-Pesini, E., Lapeña, A.C., Díez-Sánchez, C., Pérez-Martos, A., Montoya, J., Alvarez, E., Díaz, M., Urriés, A., Montoro, L., López-Pérez, M.J., Enríquez, J.A., 2000. Human mtDNA haplogroups associated with high or reduced spermatozoa motility. *Am J Hum Genet* 67, 682–696. <https://doi.org/10.1086/303040>
- Russ, W.P., Engelman, D.M., 2000. The GxxxG motif: a framework for transmembrane helix-helix association. *J Mol Biol* 296, 911–919. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.3489>
- Russell, L.D., Malone, J.P., MacCurdy, D.S., 1981. Effect of the microtubule disrupting agents, colchicine and vinblastine, on seminiferous tubule structure in the rat. *Tissue Cell* 13, 349–367. [https://doi.org/10.1016/0040-8166\(81\)90010-0](https://doi.org/10.1016/0040-8166(81)90010-0)
- Russell, L.D., Peterson, R.N., 1985. Sertoli cell junctions: morphological and functional correlates. *Int Rev Cytol* 94, 177–211. [https://doi.org/10.1016/s0074-7696\(08\)60397-6](https://doi.org/10.1016/s0074-7696(08)60397-6)
- Saftig, P., Klumperman, J., 2009. Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 623–635. <https://doi.org/10.1038/nrm2745>
- Saha, T., 2012. LAMP2A overexpression in breast tumors promotes cancer cell survival via chaperone-mediated autophagy. *Autophagy* 8, 1643–1656. <https://doi.org/10.4161/auto.21654>
- Sahu, R., Kaushik, S., Clement, C.C., Cannizzo, E.S., Scharf, B., Follenzi, A., Potolicchio, I., Nieves, E., Cuervo, A.M., Santambrogio, L., 2011. Microautophagy of Cytosolic Proteins by Late Endosomes. *Developmental Cell* 20, 131–139. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.12.003>
- Saito, D., Tanaka, M., 2009. Comparative aspects of gonadal sex differentiation in medaka: a conserved role of developing oocytes in sexual canalization. *Sex Dev* 3, 99–107. <https://doi.org/10.1159/000223075>
- Sakai, Y., Yamashina, S., 1989. Mechanism for the removal of residual cytoplasm from spermatids during mouse spermiogenesis. *Anat Rec* 223, 43–48. <https://doi.org/10.1002/ar.1092230107>
- Sakamoto, S., Thumkeo, D., Ohta, H., Zhang, Z., Huang, S., Kanchanawong, P., Fuu, T., Watanabe, S., Shimada, K., Fujihara, Y., Yoshida, S., Ikawa, M., Watanabe, N., Saitou, M., Narumiya, S., 2018. mDia1/3 generate cortical F-actin meshwork in Sertoli cells that is continuous with contractile F-actin bundles and indispensable for spermatogenesis and male fertility. *PLoS Biol* 16, e2004874. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2004874>

- Santoriello, C., Zon, L.I., 2012. Hooked! Modeling human disease in zebrafish. *J Clin Invest* 122, 2337–2343. <https://doi.org/10.1172/JCI60434>
- Sawatari, E., Shikina, S., Takeuchi, T., Yoshizaki, G., 2007. A novel transforming growth factor-beta superfamily member expressed in gonadal somatic cells enhances primordial germ cell and spermatogonial proliferation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Dev Biol* 301, 266–275. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.10.001>
- Schmidt, H., Carter, A.P., 2016. Review: Structure and mechanism of the dynein motor ATPase. *Biopolymers* 105, 557–567. <https://doi.org/10.1002/bip.22856>
- Schneider, Jaime L., Suh, Y., Cuervo, A.M., 2014. Deficient chaperone-mediated autophagy in liver leads to metabolic dysregulation. *Cell Metab* 20, 417–432. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.06.009>
- Schneider, Jaime L., Suh, Y., Cuervo, A.M., 2014. Deficient Chaperone-Mediated Autophagy in Liver Leads to Metabolic Dysregulation. *Cell Metabolism* 20, 417–432. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.06.009>
- Schneider, J.L., Villarroya, J., Diaz-Carretero, A., Patel, B., Urbanska, A.M., Thi, M.M., Villarroya, F., Santambrogio, L., Cuervo, A.M., 2015. Loss of hepatic chaperone-mediated autophagy accelerates proteostasis failure in aging. *Aging Cell* 14, 249–264. <https://doi.org/10.1111/accel.12310>
- Schteingart, H.F., Meroni, S.B., Cánepa, D.F., Pellizzari, E.H., Cigorraga, S.B., 1999. Effects of basic fibroblast growth factor and nerve growth factor on lactate production, gamma-glutamyl transpeptidase and aromatase activities in cultured Sertoli cells. *Eur J Endocrinol* 141, 539–545. <https://doi.org/10.1530/eje.0.1410539>
- Schulz, R., França, L., Lareyre, J.-J., Le Gac, F., Legac, F., Chiarini-Garcia, H., Nóbrega, R., Miura, T., 2009. Spermatogenesis in fish. General and comparative endocrinology 165, 390–411. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.02.013>
- Schulz, R.W., Menting, S., Bogerd, J., França, L.R., Vilela, D.A.R., Godinho, H.P., 2005. Sertoli cell proliferation in the adult testis--evidence from two fish species belonging to different orders. *Biol Reprod* 73, 891–898. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.105.039891>
- Schwarz, D.S., Blower, M.D., 2016. The endoplasmic reticulum: structure, function and response to cellular signaling. *Cell Mol Life Sci* 373, 79–94. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-2052-6>
- Shang, Y., Wang, H., Jia, P., Zhao, H., Liu, C., Liu, W., Song, Z., Xu, Z., Yang, L., Wang, Y., Li, W., 2016. Autophagy regulates spermatid differentiation via degradation of PDLIM1. *Autophagy* 12, 1575–1592. <https://doi.org/10.1080/15548627.2016.1192750>
- Shen, X.-H., Jin, Y.-X., Liang, S., Kwon, J.-W., Zhu, J.-W., Lei, L., Kim, N.-H., 2018. Autophagy is required for proper meiosis of porcine oocytes maturing in vitro. *Sci Rep* 8, 12581. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29872-y>
- Singh, R., Kaushik, S., Wang, Y., Xiang, Y., Novak, I., Komatsu, M., Tanaka, K., Cuervo, A.M., Czaja, M.J., 2009. Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature* 458, 1131–1135. <https://doi.org/10.1038/nature07976>
- Song, M., Gutzeit, H.O., 2003. Effect of 17-alpha-ethynylestradiol on germ cell proliferation in organ and primary culture of medaka (*Oryzias latipes*) testis. *Dev Growth Differ* 14, 327–337. <https://doi.org/10.1046/j.1440-169x.2003.00701.x>
- Sooparb, S., Price, S.R., Shaoguang, J., Franch, H.A., 2004. Suppression of chaperone-mediated autophagy in the renal cortex during acute diabetes mellitus. *Kidney Int* 65, 2135–2144. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2004.00639.x>
- Spence, R., Gerlach, G., Lawrence, C., Smith, C., 2008. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biol Rev Camb Philos Soc* 83, 13–34. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2007.00030.x>

- Stanton, P.G., 2016. Regulation of the blood-testis barrier. *Semin Cell Dev Biol* 59, 166–173. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2016.06.018>
- Staudt, C., Puissant, E., Boonen, M., 2016. Subcellular Trafficking of Mammalian Lysosomal Proteins: An Extended View. *Int J Mol Sci* 18, 47. <https://doi.org/10.3390/ijms18010047>
- Streisinger, G., Walker, C., Dower, N., Knauber, D., Singer, F., 1981. Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*). *Nature* 291, 293–296. <https://doi.org/10.1038/291293a0>
- Subramani, J., Kundumani-Sridharan, V., Das, K.C., 2021. Chaperone-Mediated Autophagy of eNOS in Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury. *Circ Res* 129, 930–945. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.120.317921>
- Suzuki, J., Nakajima, W., Suzuki, H., Asano, Y., Tanaka, N., 2017. Chaperone-mediated autophagy promotes lung cancer cell survival through selective stabilization of the pro-survival protein, MCL1. *Biochem Biophys Res Commun* 482, 1334–1340. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.12.037>
- Tadokoro, Y., Yomogida, K., Ohta, H., Tohda, A., Nishimune, Y., 2002. Homeostatic regulation of germinal stem cell proliferation by the GDNF/FSH pathway. *Mech Dev* 113, 29–39. [https://doi.org/10.1016/s0925-4773\(02\)00004-7](https://doi.org/10.1016/s0925-4773(02)00004-7)
- Takikita, S., Myerowitz, R., Schreiner, C., Baum, R., Raben, N., Plotz, P.H., 2009. The values and limits of an in vitro model of Pompe disease: the best laid schemes o’ mice an’ men. *Autophagy* 5, 729–731. <https://doi.org/10.4161/auto.5.5.8525>
- Tang, Q., Abdelfattah, N.S., Blackburn, J.S., Moore, J.C., Martinez, S.A., Moore, F.E., Lobbardi, R., Tenente, I.M., Ignatius, M.S., Berman, J.N., Liwski, R.S., Houvras, Y., Langenau, D.M., 2014. Optimized cell transplantation using adult rag2 mutant zebrafish. *Nat Methods* 11, 821–824. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3031>
- Tarique, I., Vistro, W.A., Bai, X., Yang, P., Hong, C., Huang, Y., Haseeb, A., Liu, E., Gandahi, N.S., Xu, M., Liu, Y., Chen, Q., 2019. LIPOPHAGY: a novel form of steroidogenic activity within the LEYDIG cell during the reproductive cycle of turtle. *Reprod Biol Endocrinol* 17, 19. <https://doi.org/10.1186/s12958-019-0462-2>
- Taylor, J.S., Braasch, I., Frickey, T., Meyer, A., Van de Peer, Y., 2003. Genome duplication, a trait shared by 22000 species of ray-finned fish. *Genome Res* 13, 382–390. <https://doi.org/10.1101/gr.640303>
- Tekirdag, K., Cuervo, A.M., 2018. Chaperone-mediated autophagy and endosomal microautophagy: Jointed by a chaperone. *J Biol Chem* 293, 5414–5424. <https://doi.org/10.1074/jbc.R117.818237>
- Terasawa, K., Kato, Y., Ikami, Y., Sakamoto, K., Ohtake, K., Kusano, S., Tomabechei, Y., Kukimoto-Niino, M., Shirouzu, M., Guan, J.-L., Kobayashi, T., Iwata, T., Watabe, T., Yokoyama, S., Hara-Yokoyama, M., 2021. Direct homophilic interaction of LAMP2A with the two-domain architecture revealed by site-directed photo-crosslinks and steric hindrances in mammalian cells. *Autophagy* 17, 4286–4304. <https://doi.org/10.1080/15548627.2021.1911017>
- Terasawa, K., Tomabechei, Y., Ikeda, M., Ehara, H., Kukimoto-Niino, M., Wakiyama, M., Podyma-Inoue, K.A., Rajapakshe, A.R., Watabe, T., Shirouzu, M., Hara-Yokoyama, M., 2016. Lysosome-associated membrane proteins-1 and -2 (LAMP-1 and LAMP-2) assemble via distinct modes. *Biochem Biophys Res Commun* 479, 489–495. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.09.093>
- Thierer, J.H., Ekker, S.C., Farber, S.A., 2019. The LipoGlo reporter system for sensitive and specific monitoring of atherogenic lipoproteins. *Nat Commun* 10, 3426. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11259-w>

- Thompson, L.M., Aiken, C.T., Kaltenbach, L.S., Agrawal, N., Illes, K., Khoshnan, A., Martinez-Vincente, M., Arrasate, M., O'Rourke, J.G., Khashwji, H., Lukacsovich, T., Zhu, Y.-Z., Lau, A.L., Massey, A., Hayden, M.R., Zeitlin, S.O., Finkbeiner, S., Green, K.N., LaFerla, F.M., Bates, G., Huang, L., Patterson, P.H., Lo, D.C., Cuervo, A.M., Marsh, J.L., Steffan, J.S., 2009. IKK phosphorylates Huntingtin and targets it for degradation by the proteasome and lysosome. *J Cell Biol* 187, 1083–1099. <https://doi.org/10.1083/jcb.200909067>
- Todde, V., Veenhuis, M., van der Klei, I.J., 2009. Autophagy: principles and significance in health and disease. *Biochim Biophys Acta* 1792, 3–13. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2008.10.016>
- Traver, D., Winzeler, A., Stern, H.M., Mayhall, E.A., Langenau, D.M., Kutok, J.L., Look, A.T., Zon, L.I., 2004. Effects of lethal irradiation in zebrafish and rescue by hematopoietic cell transplantation. *Blood* 104, 1298–1305. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-01-0100>
- Uchida, D., Yamashita, M., Kitano, T., Iguchi, T., 2004. An aromatase inhibitor or high water temperature induce oocyte apoptosis and depletion of P450 aromatase activity in the gonads of genetic female zebrafish during sex-reversal. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 137, 11–20. [https://doi.org/10.1016/s1095-6433\(03\)00178-8](https://doi.org/10.1016/s1095-6433(03)00178-8)
- Ueda, H., Kambegawa, A., Nagahama, Y., 1985. Involvement of gonadotrophin and steroid hormones in spermiation in the amago salmon, *Oncorhynchus rhodurus*, and goldfish, *Carassius auratus*. *Gen Comp Endocrinol* 59, 24–30. [https://doi.org/10.1016/0016-6480\(85\)90415-0](https://doi.org/10.1016/0016-6480(85)90415-0)
- Uytterhoeven, V., Lauwers, E., Maes, I., Miskiewicz, K., Melo, M.N., Swerts, J., Kuenen, S., Wittcox, R., Corthout, N., Marrink, S.-J., Munck, S., Verstreken, P., 2015. Hsc70-4 Deforms Membranes to Promote Synaptic Protein Turnover by Endosomal Microautophagy. *Neuron* 88, 735–748. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.10.012>
- Vakifahmetoglu-Norberg, H., Kim, M., Xia, H.-G., Iwanicki, M.P., Ofengeim, D., Coloff, J.L., Pan, L., Ince, T.A., Kroemer, G., Brugge, J.S., Yuan, J., 2013. Chaperone-mediated autophagy degrades mutant p53. *Genes Dev* 27, 1718–1730. <https://doi.org/10.1101/gad.220897.113>
- Valdor, R., Mocholi, E., Botbol, Y., Guerrero-Ros, I., Chandra, D., Koga, H., Gravekamp, C., Cuervo, A.M., Macian, F., 2014. Chaperone mediated autophagy regulates T cell responses through targeted degradation of negative regulators of T cell activation. *Nat Immunol* 15, 1046–1054. <https://doi.org/10.1038/ni.3003>
- Vandepoele, K., De Vos, W., Taylor, J.S., Meyer, A., Van de Peer, Y., 2004. Major events in the genome evolution of vertebrates: paranome age and size differ considerably between ray-finned fishes and land vertebrates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 1638–1643. <https://doi.org/10.1073/pnas.0307968100>
- Varuzhanyan, G., Chan, D.C., 2020. Mitochondrial dynamics during spermatogenesis. *J Cell Sci* 133, jcs235937. <https://doi.org/10.1242/jcs.235937>
- Vélez, E.J., Schnebert, S., Goguet, M., Balbuena-Pecino, S., Dias, K., Beauclair, L., Fontagné-Dicharry, S., Véron, V., Depincé, A., Beaumatin, F., Herpin, A., Seilliez, I., 2023. Chaperone-mediated autophagy protects against hyperglycemic stress. *Autophagy*. <https://doi.org/10.1080/15548627.2023.2267415>
- Vertika, S., Singh, K.K., Rajender, S., 2020. Mitochondria, spermatogenesis, and male infertility - An update. *Mitochondrion* 54, 26–40. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2020.06.003>
- Vogiatzi, T., Xilouri, M., Vekrellis, K., Stefanis, L., 2008. Wild Type α -Synuclein Is Degraded by Chaperone-mediated Autophagy and Macroautophagy in Neuronal Cells. *J Biol Chem* 283, 23542–23556. <https://doi.org/10.1074/jbc.M801992200>

- Vogl, A.W., Du, M., Wang, X.Y., Young, J.S., 2014. Novel clathrin/actin-based endocytic machinery associated with junction turnover in the seminiferous epithelium. *Semin Cell Dev Biol* 30, 55–64. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2013.11.002>
- Vogl, A.W., Linck, R.W., Dym, M., 1983. Colchicine-induced changes in the cytoskeleton of the golden-mantled ground squirrel (*Spermophilus lateralis*) Sertoli cells. *Am J Anat* 168, 99–108. <https://doi.org/10.1002/aja.1001680110>
- Vogl, A.W., Vaid, K.S., Guttman, J.A., 2008. The Sertoli cell cytoskeleton. *Adv Exp Med Biol* 636, 186–211. https://doi.org/10.1007/978-0-387-09597-4_11
- Wang, B., Cai, Z., Tao, K., Zeng, W., Lu, F., Yang, R., Feng, D., Gao, G., Yang, Q., 2016. Essential control of mitochondrial morphology and function by chaperone-mediated autophagy through degradation of PARK7. *Autophagy* 12, 1215–1228. <https://doi.org/10.1080/15548627.2016.1179401>
- Wang, C., Tao, W., Wang, Y., Bikow, J., Lu, B., Keating, A., Verma, S., Parker, T.G., Han, R., Wen, X.-Y., 2010. Rosuvastatin, Identified From a Zebrafish Chemical Genetic Screen for Antiangiogenic Compounds, Suppresses the Growth of Prostate Cancer. *European Urology* 58, 418–426. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2010.05.024>
- Wang, F., Muller, S., 2015. Manipulating Autophagic Processes in Autoimmune Diseases: A Special Focus on Modulating Chaperone-Mediated Autophagy, an Emerging Therapeutic Target. *Frontiers in Immunology* 6.
- Wang, H., Wan, H., Li, X., Liu, W., Chen, Q., Wang, Y., Yang, L., Tang, H., Zhang, X., Duan, E., Zhao, X., Gao, F., Li, W., 2014. Atg7 is required for acrosome biogenesis during spermatogenesis in mice. *Cell Res* 24, 852–869. <https://doi.org/10.1038/cr.2014.70>
- Wang, Huizhen, Wang, Haikun, Xiong, W., Chen, Y., Ma, Q., Ma, J., Ge, Y., Han, D., 2006. Evaluation on the phagocytosis of apoptotic spermatogenic cells by Sertoli cells in vitro through detecting lipid droplet formation by Oil Red O staining. *Reproduction* 132, 485–492. <https://doi.org/10.1530/rep.1.01213>
- Wang, M., Zeng, L., Su, P., Ma, L., Zhang, M., Zhang, Y. zhen, 2021. Autophagy: a multifaceted player in the fate of sperm. *Hum Reprod Update* 28, 200–231. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmab043>
- Wang, N., Tan, H.-Y., Li, S., Feng, Y., 2017. Atg9b Deficiency Suppresses Autophagy and Potentiates Endoplasmic Reticulum Stress-Associated Hepatocyte Apoptosis in Hepatocarcinogenesis. *Theranostics* 7, 2325–2338. <https://doi.org/10.7150/thno.18225>
- Wang, R., Wang, G., 2019. Autophagy in Mitochondrial Quality Control. *Adv Exp Med Biol* 1206, 421–434. https://doi.org/10.1007/978-981-15-0602-4_19
- Wang, X.G., Orban, L., 2007. Anti-Müllerian hormone and 11 beta-hydroxylase show reciprocal expression to that of aromatase in the transforming gonad of zebrafish males. *Dev Dyn* 236, 1329–1338. <https://doi.org/10.1002/dvdy.21129>
- Wang, Y., Martinez-Vicente, M., Krüger, U., Kaushik, S., Wong, E., Mandelkow, E.-M., Cuervo, A.M., Mandelkow, E., 2009. Tau fragmentation, aggregation and clearance: the dual role of lysosomal processing. *Hum Mol Genet* 18, 4153–4170. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddp367>
- Washburn, R.L., Hibler, T., Kaur, G., Dufour, J.M., 2022. Sertoli Cell Immune Regulation: A Double-Edged Sword. *Front Immunol* 13, 913502. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.913502>
- White, E., Lattime, E.C., Guo, J.Y., 2021. Autophagy Regulates Stress Responses, Metabolism, and Anticancer Immunity. *Trends Cancer* 7, 778–789. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2021.05.003>
- White, R.M., Cech, J., Ratanasirintrao, S., Lin, C.Y., Rahl, P.B., Burke, C.J., Langdon, E., Tomlinson, M.L., Mosher, J., Kaufman, C., Chen, F., Long, H.K., Kramer, M., Datta, S., Neubergh, D., Granter, S., Young, R.A., Morrison, S., Wheeler, G.N., Zon, L.I., 2011.

- DHODH modulates transcriptional elongation in the neural crest and melanoma. *Nature* 471, 518–522. <https://doi.org/10.1038/nature09882>
- White, R.M., Sessa, A., Burke, C., Bowman, T., LeBlanc, J., Ceol, C., Bourque, C., Dovey, M., Goessling, W., Burns, C.E., Zon, L.I., 2008. Transparent adult zebrafish as a tool for in vivo transplantation analysis. *Cell Stem Cell* 2, 183–189. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2007.11.002>
- Wilhelm, D., Washburn, L.L., Truong, V., Fellous, M., Eicher, E.M., Koopman, P., 2009. Antagonism of the testis- and ovary-determining pathways during ovotestis development in mice. *Mech Dev* 126, 324–336. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2009.02.006>
- Wilhelm, M., Bonam, S.R., Schall, N., Bendorius, M., Korganow, A.-S., Lumbroso, C., Muller, S., 2021. Implication of a lysosomal antigen in the pathogenesis of lupus erythematosus. *J Autoimmun* 120, 102633. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2021.102633>
- Wilke, S., Krausze, J., Büssov, K., 2012. Crystal structure of the conserved domain of the DC lysosomal associated membrane protein: implications for the lysosomal glycocalyx. *BMC Biol* 10, 62. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-10-62>
- Wu, H., Chen, S., Ammar, A.-B., Xu, J., Wu, Q., Pan, K., Zhang, J., Hong, Y., 2015. Crosstalk Between Macroautophagy and Chaperone-Mediated Autophagy: Implications for the Treatment of Neurological Diseases. *Mol Neurobiol* 52, 1284–1296. <https://doi.org/10.1007/s12035-014-8933-0>
- Wu, S., Yan, M., Ge, R., Cheng, C.Y., 2020. Crosstalk between Sertoli and Germ Cells in Male Fertility. *Trends Mol Med* 26, 215–231. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2019.09.006>
- Xia, H.-G., Najafov, A., Geng, J., Galan-Acosta, L., Han, X., Guo, Y., Shan, B., Zhang, Y., Norberg, E., Zhang, T., Pan, L., Liu, J., Coloff, J.L., Ofengeim, D., Zhu, H., Wu, K., Cai, Y., Yates, J.R., Zhu, Z., Yuan, J., Vakifahmetoglu-Norberg, H., 2015. Degradation of HK2 by chaperone-mediated autophagy promotes metabolic catastrophe and cell death. *J Cell Biol* 210, 705–716. <https://doi.org/10.1083/jcb.201503044>
- Xilouri, M., Brekk, O.R., Landeck, N., Pitychoutis, P.M., Papisilekas, T., Papadopoulou-Daifoti, Z., Kirik, D., Stefanis, L., 2013. Boosting chaperone-mediated autophagy in vivo mitigates α -synuclein-induced neurodegeneration. *Brain* 136, 2130–2146. <https://doi.org/10.1093/brain/awt131>
- Xilouri, M., Vogiatzi, T., Vekrellis, K., Park, D., Stefanis, L., 2009. Abberant alpha-synuclein confers toxicity to neurons in part through inhibition of chaperone-mediated autophagy. *PLoS One* 4, e5515. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005515>
- Xiong, W., Wang, H., Wu, H., Chen, Y., Han, D., 2009. Apoptotic spermatogenic cells can be energy sources for Sertoli cells. *Reproduction* 137, 469–479. <https://doi.org/10.1530/REP-08-0343>
- Yang, P., Ahmed, N., Wang, L., Chen, H., Waqas, Y., Liu, T., Haseeb, A., Bangulzai, N., Huang, Y., Chen, Q., 2017. In vivo autophagy and biogenesis of autophagosomes within male haploid cells during spermiogenesis. *Oncotarget* 8, 56791–56801. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.18221>
- Yang, T., Yang, W.-X., 2020. The dynamics and regulation of microfilament during spermatogenesis. *Gene* 744, 144635. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.144635>
- Ye, L., Li, X., Li, L., Chen, H., Ge, R.-S., 2017. Insights into the Development of the Adult Leydig Cell Lineage from Stem Leydig Cells. *Front Physiol* 8, 430. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00430>
- Yefimova, M.G., Buschiazio, A., Burel, A., Lavault, M.-T., Pimentel, C., Jouve, G., Jaillard, S., Jegou, B., Bourmeyster, N., Ravel, C., 2019. Autophagy is increased in cryptorchid testis resulting in abnormal spermatozoa. *Asian J Androl* 21, 570–576. https://doi.org/10.4103/aja.aja_12_19

- Yu, Y., Wang, J., Zhou, L., Li, H., Zheng, B., Yang, S., 2021. CFAP43-mediated intra-manchette transport is required for sperm head shaping and flagella formation. *Zygote* 29, 75–81. <https://doi.org/10.1017/S0967199420000556>
- Zhang, J., Johnson, J.L., He, J., Napolitano, G., Ramadass, M., Rocca, C., Kiosses, W.B., Bucci, C., Xin, Q., Gavathiotis, E., Cuervo, A.M., Cherqui, S., Catz, S.D., 2017. Cystinosis, the small GTPase Rab11, and the Rab7 effector RILP regulate intracellular trafficking of the chaperone-mediated autophagy receptor LAMP2A. *J Biol Chem* 292, 10328–10346. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.764076>
- Zhang, L., Sun, Y., Fei, M., Tan, C., Wu, J., Zheng, J., Tang, J., Sun, W., Lv, Z., Bao, J., Xu, Q., Yu, H., 2014. Disruption of chaperone-mediated autophagy-dependent degradation of MEF2A by oxidative stress-induced lysosome destabilization. *Autophagy* 10, 1015–1035. <https://doi.org/10.4161/auto.28477>
- Zhang, Z., Lau, S.-W., Zhang, L., Ge, W., 2015a. Disruption of Zebrafish Follicle-Stimulating Hormone Receptor (*fshr*) But Not Luteinizing Hormone Receptor (*lhcg*) Gene by TALEN Leads to Failed Follicle Activation in Females Followed by Sexual Reversal to Males. *Endocrinology* 156, 3747–3762. <https://doi.org/10.1210/en.2015-1039>
- Zhang, Z., Zhu, B., Ge, W., 2015b. Genetic analysis of zebrafish gonadotropin (FSH and LH) functions by TALEN-mediated gene disruption. *Mol Endocrinol* 29, 76–98. <https://doi.org/10.1210/me.2014-1256>
- Zheng, J., Liu, H., Zhu, L., Chen, Y., Zhao, H., Zhang, W., Li, F., Xie, L., Yan, X., Zhu, X., 2019. Microtubule-bundling protein *Spef1* enables mammalian ciliary central apparatus formation. *J Mol Cell Biol* 11, 67–77. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjy014>
- Zhou, D., Li, P., Lin, Y., Lott, J.M., Hislop, A.D., Canaday, D.H., Brutkiewicz, R.R., Blum, J.S., 2005. Lamp-2a facilitates MHC class II presentation of cytoplasmic antigens. *Immunity* 22, 571–581. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.03.009>
- Zhou, J., Yang, J., Fan, X., Hu, S., Zhou, F., Dong, J., Zhang, S., Shang, Y., Jiang, X., Guo, H., Chen, N., Xiao, X., Sheng, J., Wu, K., Nie, Y., Fan, D., 2016. Chaperone-mediated autophagy regulates proliferation by targeting RND3 in gastric cancer. *Autophagy* 12, 515–528. <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1136770>
- Zhou, Q., Nie, R., Li, Y., Friel, P., Mitchell, D., Hess, R.A., Small, C., Griswold, M.D., 2008. Expression of stimulated by retinoic acid gene 8 (*Stra8*) in spermatogenic cells induced by retinoic acid: an in vivo study in vitamin A-sufficient postnatal murine testes. *Biol Reprod* 79, 35–42. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.107.066795>
- Zhuo, C., Ji, Y., Chen, Z., Kitazato, K., Xiang, Y., Zhong, M., Wang, Q., Pei, Y., Ju, H., Wang, Y., 2013. Proteomics analysis of autophagy-deficient *Atg7*^{-/-} MEFs reveals a close relationship between F-actin and autophagy. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 437, 482–488. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.06.111>
- Zirkin, B.R., Papadopoulos, V., 2018. Leydig cells: formation, function, and regulation. *Biol Reprod* 99, 101–111. <https://doi.org/10.1093/biolre/i0y059>

ABSTRACT / RÉSUMÉ

Chaperone-Mediated-Autophagy (CMA) is a major pathway of lysosomal proteolysis. As such, it has been recognized as a key player for controlling numerous cellular functions, and failure of that catabolic pathway has been associated with several pathologies. While CMA has been for a long time solely described and characterized in mammals and birds, it was only recently evidenced in fish. Reshuffling the cards regarding how the entire CMA function evolved across metazoans, that new paradigm prompted us (i) to perform an in-depth analysis of the evolutionary history of the main components of CMA and (ii) to investigate and characterize this function in a powerful fish genetic model, the Zebrafish (*Danio rerio*). Data gathered in former analyses already provided robust evidence that the *LAMP2* gene appeared at the onset of vertebrate radiation, indicating that CMA (as currently described) is *de facto* specific to that lineage. However, the observed sequence variability within the different functional domains of *LAMP2A* between phylogenetically distant vertebrate species suggests that the CMA function may have followed different evolutionary trajectories. Ultimately resulting in a variety of different cellular/physiological functions and possible outcomes, that point drove the second part of our work, focusing on the study of CMA in zebrafish. After we first adapted and validated a fluorescent reporter (KFERQ-Dendra2; previously used to track CMA in mammalian cells) in zebrafish primary embryonic cells, we found that this CMA reporter localizes, upon long-term starvation, to lysosomes and/or late endosomes in both KFERQ- and *Lamp2a*-dependent manners. These results hence provided unequivocal evidences for the existence of a functional CMA process in this fish species as well. To go further, we developed a KFERQ-Dendra2 transgenic reporter zebrafish that allows the fine monitoring and tracking of the spatiotemporal dynamic changes of CMA activity *in vivo*. Altogether our results reveal an unforeseen heterogeneity of the CMA response within the gonads of both sexes. Additionally, we could also validate the relevance of this fish model to study cell- and tissue-specific changes and tuning in CMA activity, and demonstrate an unexpected role for this function during gametogenesis. Collectively, our results shed new light on the evolutionary history of CMA, and certainly established the zebrafish as a must-have model for improving our understanding of the fundamental mechanisms involved in CMA, including testing/validating *in vivo* novel therapeutic compounds targeting this fundamental function.

L'autophagie médiée par les chaperonnes (CMA pour Chaperone-Mediated Autophagy) est une voie majeure de la protéolyse lysosomale. En tant que telle, elle a été reconnue comme un acteur clé dans le contrôle de nombreuses fonctions cellulaires, et une défaillance de cette voie catabolique est associée à plusieurs pathologies. Alors que la CMA a longtemps été décrite et caractérisée chez les mammifères et les oiseaux, elle n'a été mise en évidence que récemment chez les poissons. Ce nouveau paradigme, qui redistribue les cartes concernant l'évolution de l'ensemble de la fonction CMA chez les métazoaires, nous a incités (i) à effectuer une analyse approfondie de l'histoire évolutive des principaux composants de la CMA et (ii) à étudier et à caractériser cette fonction dans un puissant modèle génétique de poisson, le poisson zèbre (*Danio rerio*). Les données recueillies lors des analyses précédentes ont déjà fourni des preuves solides que le gène *LAMP2* est apparu au début de la radiation des vertébrés, indiquant que la CMA (telle qu'elle est décrite actuellement) est *de facto* spécifique à cette lignée. Cependant, la variabilité de séquence observée dans les différents domaines fonctionnels de *LAMP2A* entre des espèces de vertébrés phylogénétiquement éloignées suggère que la fonction CMA pourrait avoir suivi des trajectoires évolutives différentes. Il en résulte une variété de fonctions cellulaires/physiologiques différentes qui ont motivé la deuxième partie de notre travail, axée sur l'étude de la CMA chez le poisson zèbre. Après avoir adapté et validé un rapporteur fluorescent (KFERQ-Dendra2 ; précédemment utilisé pour suivre la CMA dans les cellules de mammifères) dans les cellules embryonnaires primaires du poisson zèbre, nous avons découvert que ce rapporteur CMA se localise, lors d'une mise à jeun prolongée, au niveau des lysosomes et/ou des endosomes tardifs de manière dépendante de KFERQ et de *Lamp2a*. Ces résultats ont donc fourni des preuves sans équivoque de l'existence d'une fonction CMA fonctionnelle chez cette espèce de poisson également. Pour aller plus loin, nous avons développé un poisson zèbre transgénique rapporteur KFERQ-Dendra2 qui permet de surveiller et de suivre avec précision les changements dynamiques spatio-temporels de l'activité de la CMA *in vivo*. Dans l'ensemble, nos résultats révèlent une hétérogénéité imprévue de la réponse de la CMA dans les gonades des deux sexes. En outre, nous avons pu valider la pertinence de ce modèle de poisson pour étudier les changements et l'adaptation de cette activité CMA spécifique aux cellules et aux tissus, et démontrer un rôle inattendu de cette fonction au cours de la gamétogenèse. Collectivement, nos résultats offrent un nouveau point de vue sur l'histoire évolutive de la CMA et font certainement du poisson zèbre un modèle incontournable pour améliorer notre compréhension des mécanismes fondamentaux impliqués dans la CMA, y compris pour tester/valider *in vivo* de nouveaux composés thérapeutiques ciblant cette fonction fondamentale.