

Candidature prix de thèse Beth Levine

Nom : Schnebert

Prénom : Simon

Mail : simonschnebert@gmail.com

Date de la soutenance : 11/12/2023

Directeur(trice) de thèse : Dr. Iban Seilliez

Adresse du laboratoire de thèse :

UMR1419 NuMeA

173 Route de Saint-Jean-de-Luz, 64310 Saint-Pée-sur-Nivelle

Lettre de motivation

Madame, Monsieur,

Je suis titulaire d'une thèse sur l'autophagie, réalisée à l'UMR1419 NuMeA INRAE et soutenue le 11 décembre 2023. Je souhaite soumettre ma candidature pour le prix de thèse 'Beth Levine'.

Ma recherche s'est concentrée sur le rôle de l'autophagie médiée par les chaperonnes (CMA) chez la truite arc-en-ciel. Bien que largement étudiée chez les mammifères, cette fonction cellulaire n'a été que récemment explorée chez les poissons. Mon étude visait à comprendre son fonctionnement chez ces espèces, exposées directement aux fluctuations de leur environnement.

Nous avons confirmé la présence de tous les éléments génétiques nécessaires à la CMA chez la truite. En adaptant une méthode de référence utilisée chez les mammifères, l'isolement des lysosomes, nous avons également démontré sa fonction.

En inactivant le gène clé de la CMA (*lamp2a*) chez des truites, nous avons observé une perturbation du protéome hépatique et des signes de stress oxydant, soulignant le rôle de la CMA dans le maintien de l'homéostasie cellulaire face au stress environnemental. Nous avons développé une méthode, le CMA score, pour évaluer le stress cellulaire chez la truite. Son augmentation lors d'une exposition à un stress hypoxique suggère un stress cellulaire accru.

Au cours de cette thèse, j'ai pu valoriser mes travaux à travers deux publications. La première (*Cells*, 2021), retrace l'histoire évolutive des différents éléments de la CMA au cours de l'évolution. La deuxième (*Autophagy Reports*, en révision), décrit la caractérisation et le rôle de la CMA chez la truite.

J'ai eu l'opportunité de présenter ces résultats lors de deux conférences. La première, l'ICBF (International Conference on the Biology of Fish) où j'ai pu montrer l'importance de considérer les mécanismes cellulaires pour la biologie du poisson (3ème prix de la meilleure présentation orale). La deuxième conférence, l'UK Autophagy, a été une chance de pouvoir ouvrir le monde de l'autophagie à la CMA et aux poissons. Malgré un thème « exotique » dans cette conférence, les excellents retours reçus témoignent d'un engouement de la communauté « Autophagie » pour ces nouveaux modèles et nouvelles thématiques.

Il a été très enrichissant pour moi d'étudier la CMA, un phénomène cellulaire de plus en plus décrit, et dont le rôle chez le poisson a la possibilité d'ouvrir de nombreux horizons de recherche sur l'importance des mécanismes cellulaires dans le milieu de l'écologie.

Je vous remercie.

Résumé des travaux

L'autophagie médiée par les chaperonnes (CMA) est une voie cellulaire assurant l'homéostasie cellulaire face à divers stress tels que le jeûne, le stress oxydatif et l'hypoxie¹. Elle se distingue des autres voies autophagiques car elle dégrade uniquement des protéines arborant le motif « KFERQ-like »². Alors que cette fonction est largement étudiée chez les mammifères, la découverte récente de la CMA chez les poissons offre de nouvelles perspectives quant à son rôle chez ces espèces soumises à des fluctuations environnementales³.

Au cours de cette thèse, j'ai d'abord étudié l'histoire évolutive des effecteurs de la CMA, ce qui a révélé que ce mécanisme pourrait exister chez l'ensemble des poissons. En effet, nous avons démontré que le gène *lamp2* est apparu au début de la spéciation des vertébrés, indiquant que la CMA pourrait être propre à cette lignée.

Mon objectif a ensuite été de caractériser l'expression des gènes liés à la CMA au cours du développement ainsi que dans différents tissus de truite arc-en-ciel (TAC, *Oncorhynchus mykiss*). Les résultats montrent que les gènes de la CMA sont exprimés dès les premiers stades de développement. L'étude de l'expression des 2 paralogues de *lamp2a* (portés respectivement par le chromosome 14 et le chromosome 31) a ensuite révélé une plus grande expression de la copie *lamp2a* C31 et que le jeûne stimule l'expression de *lamp2a* chez la truite.

Pour démontrer l'existence d'une CMA fonctionnelle chez cette espèce, nous avons ensuite isolé des lysosomes pour mesurer l'activité de la CMA *in vitro*. Cette technique a été développée chez la souris par l'équipe de AM Cuervo et est considérée aujourd'hui comme la technique de référence pour mesurer l'activité CMA. Nous avons adapté cette technique chez la TAC et révélé que la TAC présente une activité CMA, qui augmente après un jeûne.

Nous avons ensuite utilisé l'outil CRISPR-Cas9 pour générer une lignée de TAC « knock-out » (KO) dépourvue du gène *lamp2a* C31 (*L2A-C31 KO*), cette copie étant la plus exprimée. D'autre part, la contribution du paralogue *lamp2a* C14 à l'activité CMA semble négligeable, comme récemment démontré au laboratoire⁴. Les résultats ont d'abord montré que les TAC *L2AC31-KO* avaient un poids et une taille plus élevés que les TAC sauvages (WT), ce qui suggère une altération métabolique due à la perte potentielle de CMA. Comme la TAC est un modèle naturel d'intolérance au glucose⁵, nous avons nourri les TAC *L2AC31-KO* avec un régime riche en glucose, pour étudier le rôle de la CMA face un stress nutritionnel aigu. Après 7 semaines de ce régime, les TAC *L2AC31-KO* présentaient toujours les mêmes modifications phénotypiques (taille et poids), mais aussi de plus gros foies et intestins (HSI et GSI). Le profil lipidique hépatique montra aussi une accumulation d'acides gras monoinsaturés (MUFA) et moins d'acides gras polyinsaturés (PUFA), une composition en acides gras retrouvée dans le foie gras non alcoolique⁶.

Nous avons réalisé une étude protéomique dans le foie de TAC *L2AC31-KO* comparé aux TAC WT et constaté que les protéines surexprimées dans les TAC *L2AC31-KO* étaient principalement liées aux processus cellulaires et métaboliques. Parmi les protéines surexprimées, nous avons trouvé plusieurs protéines impliquées dans l'utilisation métabolique du glucose ainsi que dans la biosynthèse et le transport des acides gras. Il est intéressant de noter qu'un certain nombre de ces protéines ont déjà été décrites comme des substrats de la CMA chez les mammifères et possèdent un ou plusieurs motifs KFERQ chez la TAC. Ces résultats suggèrent une capacité accrue du foie des TAC *L2AC31-KO* à utiliser le glucose et à synthétiser les acides gras, en accord avec le profil lipidique hépatique altéré. Aussi, un nombre significatif de protéines associées aux processus métaboliques ont également été retrouvées sous-régulées chez les TAC KO. Nous avons remarqué la présence de l'apolipoprotéine B100, qui est impliquée dans l'assemblage et la sécrétion de lipoprotéines de très basse densité (VLDL) associées à la distribution des triglycérides excédentaires du foie vers les tissus périphériques⁷. Cette découverte soutient des perturbations dans le métabolisme lipidique hépatique.

Nous avons aussi observé une diminution des niveaux des complexes de la chaîne de transport mitochondriale, suggérant des altérations potentielles dans la respiration mitochondriale dans le foie des TAC *L2AC31-KO*. De plus, notre analyse a également révélé des niveaux élevés de plusieurs

protéines associées au métabolisme du glutathion (GSH) et aux fonctions antioxydantes chez les poissons mutants, reflétant la possible mise en place d'une réponse adaptative pour atténuer le stress oxydatif causé par une fonction mitochondriale compromise. Une diminution du rapport glutathion réduit sur glutathion oxydé fut révélée dans le foie des TAC L2AC31-KO, soutenant une situation de stress oxydatif chez les animaux déficients en lamp2a C31.

Au vu du rôle critique de la CMA dans le maintien de l'homéostasie protéique hépatique chez les TAC exposés à un stress aigu, nous avons étudié la possibilité d'adapter le « CMA score »⁸ comme outil pour évaluer l'homéostasie cellulaire chez la TAC. Nous avons d'abord validé ce score en utilisant des cellules de TAC exprimant le rapporteur CMA KFERQ-PA-mCherry¹, une méthode largement utilisée pour quantifier la CMA dans les cellules de mammifères⁹ et plus récemment validée dans les cellules de poissons^{3,4}. L'activité CMA a été induite dans des conditions connues chez les mammifères : le jeûne et un stress oxydatif. Le score CMA a ensuite montré une élévation lors de l'exposition à ces 2 conditions.

Pour tester le CMA score dans l'évaluation du stress homéostatique chez le poisson, nous avons soumis les TAC à des conditions hypoxiques modérées, connues pour induire un stress oxydatif chez les poissons^{10,11}. Nous avons observé une augmentation significative globale du score CMA dans les tissus des TAC exposés à l'hypoxie. Dans l'ensemble, ces résultats mettent en évidence l'activation de la machinerie CMA suite à un stress environnemental et soulignent l'intérêt d'utiliser le score CMA comme marqueur indicatif de l'homéostasie cellulaire chez les organismes actuellement exposés à un environnement en mutation. Il est aussi à noter que ce CMA score pourrait également permettre d'évaluer le potentiel d'une existence d'une fonction CMA dans d'autres modèles de vertébrés.

1. Kaushik, S. & Cuervo, A. M. The coming of age of chaperone-mediated autophagy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 19, 365–381 (2018).
2. Kirchner, P. et al. Proteome-wide analysis of chaperone-mediated autophagy targeting motifs. *PLOS Biol.* 17, e3000301 (2019).
3. Lescat, L. et al. Chaperone-Mediated Autophagy in the Light of Evolution: Insight from Fish. *Mol. Biol. Evol.* 37, 2887–2899 (2020).
4. Vélez, E. J. et al. Chaperone-mediated autophagy protects against hyperglycemic stress. *Autophagy* 15548627.2023.2267415 (2023) doi:10.1080/15548627.2023.2267415.
5. Palmer, T. N. & Ryman, B. E. Studies on oral glucose intolerance in fish. *J. Fish Biol.* 4, 311–319 (1972).
6. Puri, P. et al. A lipidomic analysis of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 46, 1081–1090 (2007).
7. Schlegel, A. Zebrafish Models for Dyslipidemia and Atherosclerosis Research. *Front Endocrinol* 7: 159. (2016).
8. Bourdenx, M. Chaperone-mediated autophagy prevents collapse of the neuronal metastable proteome.
9. Koga, H., Martinez-Vicente, M., Macian, F., Verkhusha, V. V. & Cuervo, A. M. A photoconvertible fluorescent reporter to track chaperone-mediated autophagy. *Nat. Commun.* 2, 386 (2011).
10. Wood, C. M. & Eom, J. The osmorepiratory compromise in the fish gill. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 254, 110895 (2021).

11. Abdel-Tawwab, M., Monier, M. N., Hoseinifar, S. H. & Faggio, C. Fish response to hypoxia stress: growth, physiological, and immunological biomarkers. *Fish Physiol. Biochem.* 45, 997–1013 (2019).

Thèse en PDF

https://cfatg.org/wp-content/uploads/2024/03/SCHNEBERT_2023_FINALE.pdf