

Études fonctionnelles de gènes mutés dans les syndromes néphrotiques héréditaires

Julie Patat

► To cite this version:

Julie Patat. Études fonctionnelles de gènes mutés dans les syndromes néphrotiques héréditaires. Biochimie, Biologie Moléculaire. 2020. hal-02907383

HAL Id: hal-02907383 https://ephe.hal.science/hal-02907383

Submitted on 27 Jul2020

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.





MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES

Sciences de la Vie et de la Terre

MÉMOIRE

Présenté par

Julie PATAT

pour l'obtention du diplôme de l'École Pratique des Hautes Études

Études fonctionnelles de gènes mutés dans les syndromes néphrotiques héréditaires

Soutenu le 2 juillet 2020 devant le jury suivant :

Dr. Jessie COLIN - Présidente

Dr. Géraldine MOLLET et Pr. Corinne ANTIGNAC - Tutrices scientifiques

Dr. Sophie GAD-LAPITEAU - Tutrice pédagogique

Dr. Stéphanie TOMÉ - Rapportrice

Dr. Morgan GALLAZZINI - Examinateur

Mémoire préparé sous la direction de :

Dr. Géraldine MOLLET et Pr. Corinne ANTIGNAC Laboratoire des maladies rénales héréditaires dirigé par Dr. Sophie SAUNIER U1163 - Institut Imagine 26, boulevard du Montparnasse – 75015 Paris et de Dr. Sophie GAD-LAPITEAU Groupe « Cancer du rein » dirigé par Pr. Stéphane RICHARD UMR CNRS 9019 - Institut Gustave-Roussy 114 Rue Edouard Vaillant - 94800 Villejuif Groupe de recherche et d'enseignement thématique de l'EPHE : « Génomes, cancers et thérapies » « Une théorie qui n'est réfutable par aucun événement qui se puisse concevoir est dépourvue de caractère scientifique. » Karl Popper, Conjectures et réfutations, 1963

REMERCIEMENTS

En premier lieu, je tiens à exprimer ma profonde gratitude au Pr Corinne Antignac, directrice du laboratoire, pour m'avoir toujours encouragée à reprendre mes études et pour son soutien indéfectible tout au long de ma formation du diplôme de l'EPHE.

Je remercie également le Dr Géraldine Mollet qui m'a accompagnée en tant que tutrice scientifique. Merci pour tes encouragements, tes conseils inépuisables lors de nos réunions hebdomadaires sur l'orientation de mon projet ainsi que les corrections à mon mémoire.

Je voudrais adresser toute ma gratitude au Dr Sophie Gad-Lapiteau, pour m'avoir suivie tout le long de mon diplôme EPHE en tant que tutrice pédagogique dès mon inscription en septembre 2017. Son investissement dans mon encadrement, sa disponibilité, ses conseils aussi bien sur la formation que sur ma poursuite d'études ont été très précieux.

Je remercie les trois autres membres du jury, Jessie Colin, Stéphanie Tomé et Morgan Gallazzini pour avoir accepté d'évaluer mon travail.

Je remercie chaleureusement Christelle Arrondel, qui m'a épaulée lors les différentes expériences que j'ai effectuées durant ma formation à l'EPHE mais également depuis mon entrée au laboratoire en 2015. Je ne compte plus les nombreux conseils avisés qui m'ont aidée à mener à bien mon projet. Merci également pour ta disponibilité, la justesse de tes remarques et ta bonne humeur. Merci également d'avoir participé aux corrections de mon rapport.

Merci à Sara Gonçalves de m'avoir fait découvrir le monde passionnant de la drosophile et de m'avoir donné envie de continuer mes études.

Merci à Frances Tilley de m'avoir aidé à corriger mon mémoire, et pour ses précieux conseils musicaux mais également pour nos discussions interminables sur le pays qui nous aimons toutes les deux : LE JAPON.

Merci à Daniel Pouly pour son humour tout droit sortie d'un carambar et son amour pour les sushis.

Merci à Yoann Martin, Alexia Mahuzier et Marceau Quatredeniers pour nos rendez-vous café quotidiens.

Merci à Esther Porée pour sa patience et ses encouragements lorsqu'elle m'a aidée à manipuler les souris.

Merci à Olivier Gribouval le macgyver du labo, pour sa disponibilité et sans lequel la moitié des machines du laboratoire seraient tombées en panne depuis longtemps.

Merci à Mikaëlle Bocel pour nous avoir fait découvrir sa « tisane bretonne » (à base d'éthanol 70 %) et pour nos échanges de vidéos toutes plus drôles les unes que les autres (*wesh t'as vu, t'es dans mes cimer-ciment, trop la classe !*)

Merci à Meriem Garfa-Traoré pour m'avoir fait découvrir la microscopie confocale et pour sa bonne humeur.

Merci à Yann Zimmerman pour son inébranlable bonne humeur lors des innombrables prélèvements d'urines et des pesées que nous avons réalisés pendant cette étude.

Merci à Pierre David, responsable de la plateforme de transgénèse à l'Institut Imagine de m'avoir fait participer à la micro-injection des guides CRISPR dans le zygote murin et de m'avoir permis d'assister à la réimplantation.

Merci également aux Anciens, ceux qui étaient là quand j'ai débuté au sein du laboratoire et qui sont maintenant partis vers de nouvelles aventures : Gweltas Odye, Charline Henry, Lara De Tomasi, Louise Reilly, Marie Dupont, Albane Bizet, Gaëlle Martin sans lesquels ma vie au laboratoire n'aurait pas été aussi facile.

Je remercie l'équipe du laboratoire des maladies rénales héréditaires dans son ensemble : merci à vous tous, Sophie Saunier, Alexandre Benmerah, Cécile Jeanpierre, Laurence Heidet, Aude Servais, Olivia Boyer, Guillaume Dorval, Julie Pernelle, Flora Legendre, Amandine Viau, Alice Serafin, Bruno Estebe, Bastien Masson, Eléonore Birgy, Giulia Menara, Francesco Miscia, Katy Billot, Salomé Ceccarelli, Friederike Petzold, Magalie Lodin et Aurélien Juven.

Je remercie également le laboratoire des drosophilistes qui ont toujours été là pour répondre à mes questions sur les drosophiles. Merci à Zvonimir Marelja, Gwenn Le Meur, Magda Cannata Serio, Virginia Marchesin, Albert Marti et Luigi De La Motte.

Je remercie mon entourage, famille et amis, pour leur soutien et leurs encouragements notamment ma mère Isabelle, ma sœur Marie ainsi que Clara pour m'avoir supporté pendant toutes ces années (mais il en reste d'autres, j'en ai peur) ainsi que leur participation aux corrections de mon mémoire.

SOMMAIRE

LISTE DES ABRÉVIATIONS	3
LISTE DES FIGURES	4
LISTE DES TABLEAUX	7
AVANT-PROPOS	8
INTRODUCTION	9
I. La barrière de filtration glomérulaire	10
A. Introduction	10
1. Rein : Fonction et organisation	10
2. Le néphron : unité fonctionnelle du rein	11
3. Les différents constituants du glomérule	12
B. Le podocyte, cellule clé de la barrière de filtration glomérulaire	15
1. Les différents domaines membranaires du podocyte	15
2. Le cytosquelette du podocyte	18
II. Le syndrome néphrotique	18
A. Aspects anatomiques	19
B. Réponse à la cortico-thérapie	20
III. Les podocytopathies héréditaires	21
A. Mode de transmission et caractéristiques cliniques	21
B. Aspects moléculaires des podocytopathies	21
C. Le syndrome de Galloway-Mowat (GAMOS)	25
1. Aspects cliniques et anatomopathologiques	25
2. Aspects moléculaires	26
3. Le complexe KEOPS	27
IV. Outils pour modéliser les syndromes néphrotiques héréditaires	28
A. Le modèle de la drosophile	28
B. Les modèles murins	33
OBJECTIFS GÉNÉRAUX	35
1 ^{ÈRE} PARTIE : ÉTUDES FONCTIONNELLES DE DEUX GÈNES CANDIDATS DE SYNDROME NÉPHROTIQ HÉRÉDITAIRE CHEZ LA DROSOPHILE	UE 37
A. Contexte	38
B. Objectifs	40
C. Matériels et méthodes	40
1. Modèle de la drosophile	40

	2.	Immunofluorescence	42
	3.	Test de géotaxie	43
	4.	Statistiques	43
D.	Ré	ésultats	43
	1.	Effet de chaque mutation sur le phénotype des drosophiles hts ^{null} ou Gcn5 ^{null}	43
	2.	Effet de chaque mutation sur le phénotype rénal des drosophiles hts ^{null} ou Gcn5 ^{null}	46
	3.	Étude des effets synergiques d'ADDy et KAT2B spécifiquement dans les néphrocytes	47
E.	Di	scussion – conclusion	49
2 ^{ÈME}	PAR	TIE : RÔLE DU COMPLEXE KEOPS DANS LA PHYSIOPATHOLOGIE DU GAMOS	52
A.	Сс	ontexte	53
В.	O	bjectifs de recherche	54
C.	Μ	atériels et Méthodes	54
	1.	Culture cellulaire et transfection dans les HEK293T	54
	2.	Western Blot	55
	3.	Conception et validation des guides CRISPR	55
	4.	Injection des constructions CRISPR dans le zygote murin	57
	5.	Génotypage	57
	6.	Séquençage Sanger	59
	7.	Histologie rénale et cérébrale	60
	8.	SDS-page au bleu de Coomassie	60
	9.	Extraction d'ARN et RT-qPCR	61
	10.	Construction des plasmides contenant les shARN	63
	11.	Culture cellulaire et co-transfection des plasmides dans les IMCD	63
	12.	Électroporation in utero	64
	13.	Statistiques	64
D.	Ré	ésultats	64
	1.	Étude <i>in vitro</i> de la stabilité du complexe KEOPS	64
	2.	Étude <i>in vivo</i> du complexe KEOPS chez la souris	67
	3.	Inactivation des gènes du complexe KEOPS par électroporation in utero	92
E.	Di	scussion – perspectives	94
	1.	Etude <i>in vitro</i> de la stabilité du complexe KEOPS	94
	2.	Etude <i>in vivo</i> du complexe KEOPS chez la souris	96
CON	CLUS	SION GÉNÉRALE1	00
RÉFÉ	ÉREN	CES BIBLIOGRAPHIQUES1	02
ANN	IEXES	1	12

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AD : Autosomique dominant ADN : Acide désoxydibonucléique ADNc : ADN complémentaire ADNg : ADN génomique AR : Autosomique récessif ARN : Acide RiboNucléique ARNg : ARN guide ARNm : ARN messager ARNt : ARN de transfert BFG : Barrière de filtration glomérulaire SNC : Système nerveux central CRISPR : Clustered Regulary Interspaced Short palindromique Repeats (Courtes répétitions palindromiques groupées et régulièrement espacées) GAMOS : Galloway Mowat syndrome (syndrome de Galloway-Mowat) H&E : Hématoxyline et éosine IRT : Insuffisance rénale terminale KEOPS : Kinase and endopeptidase of other Proteins of small size (kinase et autres protéines de petites tailles) MFG : Membrane de filtration glomérulaire OMIM : Online mendelian inheritance in man (héritage mendélien chez l'humain) PAS : Periodic acid shiff (acide périodique de Schiff) PBS : Phosphate buffered saline (tampon phosphate salin) **PBST : PBS-Tween** PCR : Polymerase Chain Reaction (réaction de polymérisation en chaîne) **RT** : Reverse transcription RT-qPCR : PCR quantitative en temps réel SMD : Sclérose mésenchiale diffuse SN : Syndrome néphrotique SNI : Syndrome néphrotique isolé SNCS : Syndrome néphrotique cortico-sensible SNCR : Syndrome néphrotique cortico-résistant SVF : Sérum de veau foetal TriC: Trichrome UAS : Up stream activator sequence (séquence d'activation en amont)

WES : Whole Exome Sequencing (séquençage des exons)

LISTE DES FIGURES

Figure n°1 : Représentation schématique d'une coupe longitudinale de rein	. 10
Figure n°2 : Représentation schématique d'un néphron	. 11
Figure n°3 : Représentation schématique d'un glomérule d'après Machuca et al., 2009. A	. 12
Figure n°4 : Les différents composants de la barrière de filtration glomérulaire vus en microscopie	
électronique à transmission	. 13
Figure n°5 : Architecture des podocytes dans un glomérule de rat	14
Figure n°6 : Les différents domaines de la membrane des pédicelles	. 15
Figure n°7 : Le diaphragme de fente	. 16
Figure n°8 : Schéma de la barrière de filtration glomérulaire d'après (Machuca et al., 2009)	. 17
Figure n°9 : Section d'un pédicelle et représentation schématique de l'organisation des filaments	
d'actine du pédicelle	. 18
Figure n°10 : Effacement des pédicelles vu en microscopie électronique	. 19
Figure n°11 : Eventail des lésions glomérulaires causées par le SNI	. 20
Figure n°12 : Représentation schématique de la nature, fonction et localisation dans les pédicelles	
des différentes classes de protéines mutées dans les podocytopathies	. 25
Figure n°13. Représentation de la voie de biosynthèse de la modification t ⁶ A	. 27
Figure n°14 : Représentation schématique du complexe KEOPS	. 28
Figure n°15 : Cycle de vie des Drosophile	. 29
Figure n°16 : Comparaison du système excréteur de la drosophile et des mammifères	. 30
Figure n°17 : Localisation des néphrocytes chez la larve et la mouche adulte	. 31
Figure n°18: Schéma de comparaison des composants moléculaires des DF des podocytes et des	
néphrocytes	. 31
Figure n°19 : Les différents usages du système UAS-GAL4 chez la drosophile	. 32
Figure n°20 : Arbres généalogiques et ségrégation des mutations identifiées dans les gènes ADD3 (et
KAT2B dans les familles A, B et C.	. 38
Figure n°21 : Schéma de l'ADNc et de la protéine avec la localisation et la conservation des mutation	ons
dans les familles A, B et C pour les gènes ADD3 et KAT2B	. 39
Figure n°22 : Croisement des Drosophiles pour obtenir les lignées Hts ^{null} /Df(2R);UAS-ADD3WT et U	JAS-
Gcn5WT ;Gcn5 ^{E333st} /Df(3R)	. 41
Figure n°23 : Les différentes utilisations du système UAS-GAL4 chez la drosophile	. 42
Figure n°24 : Étude des différents transgènes ADD1 et/ou ADD3 sur fonds Hts ^{null}	. 44
Figure n°25 : Étude des différents transgènes Gcn5 sur fonds Gcn5 ^{null}	. 45
Figure n°26 : Néphrocytes péricardiques à 15 jours issus des mouches déficientes Hts ^{null} exprimant	t
ADDαy WT ou ADDαy p.E659Q.	. 46
Figure n°27 : Néphrocytes péricardiques issus de mouches exprimant Gcn5 WT et Gcn5 p.F304S su	ır
fonds Gcn5 ^{null}	. 47
Figure n°28 : Effet synergique entre les gènes hts et Gcn5 sur les néphrocytes péricardiques à 3 jou	urs
et à 15 jours	. 48
Figure n°29 : Néphrocytes péricardiques à 3 jours issus de mouches exprimant ADDay WT ou ADD	αν
p.F6590 sur un fonds double KD Hts ^{RNAi} et Gcn5 ^{RNAi}	. 49
Figure n°30 : Schéma de la dimérisation du complexe KEOPS en fonction de la présence de GON7	. 53
Figure n°31 : Principe de la technologie CRISPR/Cas9	. 56
Figure n°32 : Séquence des guides choisis et du ssODN pour le gène Osgen	. 56
Figure n°33 : Séquences des guides choisis et du ssODN pour le gène Lage3	. 56

Figure n°34 : Schéma des différentes tailles attendues des produits de PCR et digestion par KpnI 58
Figure n°35 : Schéma des différentes tailles attendues des produits de PCR et digestion par Pvull 58
Figure n°36 : Effet de la co-expression des protéines GON7 et LAGE3 sur leur niveau d'expression
protéique65
Figure n°37 : Étude de la demi-vie de GON7 et LAGE3 après traitement à la cycloheximide 66
Figure n°38 : Alignement entre la séquence WT et les quatre guides choisis grâce au logiciel CRISPOR-
tefor
Figure n°39 : Schéma de la partie du ssODN Osgep portant la mutation AGG en CGG et le site KpnI. 68
Figure n°40 : Schéma de la partie du ssODN Lage3 portant les mutations GTCC conduisant à
l'apparition du site Pvull et Hpall ainsi que la mutation TTT en TCC69
Figure n°41 : PCR Osgep et Lage3 sur les blastocystes injectés avec les guides CRISPR
Figure n°42 : Séquençage Sanger des blastocystes WT et hétérozygotes
Figure n°43 : Tailles attendues des amplicons après digestion par KpnI et PCR puis digestion de la
région d'intérêt du gène Osgep à partir de l'ADNg murin71
Figure n°44 : Séquençage Sanger de l'ADN des souris WT et porteuses de la variation protéique
Osgep p.R325Q
Figure n°45 : Tailles attendues des amplicons PCR après digestion par Pvull et PCR puis digestion par
Pvull de la région d'intérêt du gène Lage3 à partir de l'ADN génomique murin
Figure n°46 : Séquençage Sanger des souris WT et de Lage3 Ki hémizygote
Figure n°47 : Représentation schématique des deux premières générations de souris et génotypage
par PCR/digestion des animaux de F1 de la lignée Osgep73
Figure n°48 : Représentation schématique d'un accouplement et génotypage par PCR/digestion des
animaux de la génération F2 de la lignée Osgep74
Figure n°49 : Représentation schématique d'un accouplement et génotypage par PCR/digestion des
animaux de la génération F1 pour la lignée Lage375
Figure n°50 : Représentation schématique d'un accouplement et génotypage par PCR/ digestion des
animaux de génération F2 pour la lignée Lage3
Figure n°51 : Aspect d'une souris Osgep WT et Osgep Ki homozygote à 275 jours et d'une souris
Lage3 WT et Lage3 Ki hémizygote à 55 jours77
Figure n°52 : Courbe de poids et de survie des animaux Osgep WT et Osgep Ki hom
Figure n°53 : Courbe de poids et de survie des souris Lage3 WT et Lage3 Ki hémi
Figure n°54 : Analyse de la protéinurie chez les souris Lage3 Ki hémi et WT à 43 et 46 jours
Figure n°55 : Dosages biochimiques de différents ions présents dans les urines des animaux Osgep
WT et Osgep Ki hom 80
Figure n°56 : Coupes histologiques des reins des souris WT et Osgep Ki hom
Figure n°57 : Coupes histologiques de reins des souris WT et Lage3 Ki hémi
Figure n°58 : Coupes histologiques du cerveau d'une souris WT et d'une souris Osgep Ki hom 82
Figure n°59 : Coupes histologiques du cerveau d'une souris WT et d'une souris Lage3 Ki hémi
Figure n°60 : Analyse de l'expression des gènes du complexe KEOPS dans le cerveau des souris WT et
des souris Osgep Ki hom
Figure n°61 : Analyse de l'expression des genes du complexe KEOPS dans le rein des souris WT et des
souris Osgep Ki nom
Figure n°62 : Analyse de l'expression des genes du complexe KEOPS dans le cerveau des souris WT et
Lages N Herri
Figure 11 os . Analyse de Lexpression des genes du complexe KEOPS dans le rein des souris WT et
Lages NI Hellill
rigure it 64 . Schema de croisement des souris Osgep ki nom et KO het de la lignee KI/KO

Э
9
et:
9
0
0
1
1
1
2
3
4

LISTE DES TABLEAUX

Tableau n°1 : Gènes mutés dans les podocytopathies	24
Tableau n°2 : Liste des gènes mutés dans le GAMOS	26
Tableau n°3 : Orthologues chez la drosophile des gènes mutés dans les SNCR	31
Tableau n°4 : Phénotypes observé dans les différentes conditions testées	49
Tableau n°5 : Séquence des amorces utilisées pour réaliser les PCR des blastocystes injectés	59
Tableau n°6 : Séquence des amorces utilisées pour réaliser la PCR Os4A	59
Tableau n°7 : Séquence des amorces utilisées pour réaliser les RT-qPCR des 5 membres du compl	exe
KEOPS	62
Tableau n°8 : Résultats de génotypage des blastocystes pour les quatre guides choisis	70
Tableau n°9 : Nombre d'animaux obtenu à la génération F0	71

AVANT-PROPOS

J'ai préparé mon Diplôme de l'EPHE mention Sciences de la vie et de la terre à l'Institut Imagine de l'hôpital Necker (Paris) dans le laboratoire des maladies génétiques rénales héréditaires dirigé par le Pr Corinne Antignac. Le laboratoire travaille sur l'identification de gènes responsables de maladies rénales héréditaires rares dont le syndrome néphrotique (SN) héréditaire, et en particulier le syndrome de Galloway-Mowat (GAMOS). Le SN, quel qu'en soit la cause, est caractérisé par une protéinurie (perte de protéines dans les urines), une diminution du niveau d'albumine ainsi qu'une augmentation des lipides dans le sang. Il est dû à une anomalie de la barrière de filtration du glomérule rénal, la plupart du temps à une anomalie structurale de son composant majeur, le podocyte. Le podocyte est une cellule épithéliale spécialisée qui a une forme particulière car elle possède des prolongements cytoplasmiques appelés pédicelles qui entourent les capillaires sanguins. Chez les patients atteints de SN, un effacement des pédicelles est constamment observé en microscopie électronique. Dans le GAMOS, le SN est associé à une microcéphalie et à des anomalies du système nerveux central (Galloway and Mowat, 1968). Il n'existe à ce jour aucun traitement, mis à part la dialyse et la transplantation rénale.

INTRODUCTION

I. La barrière de filtration glomérulaire

A. Introduction

1. <u>Rein : Fonction et organisation</u>

Les êtres humains possèdent deux reins situés dans le bas du dos. Le rein fait partie de l'appareil urinaire et il a plusieurs fonctions très importantes pour l'organisme. Sa fonction principale est l'élimination des déchets toxiques produits par l'organisme et transportés par le sang (urée, créatinine, acide urique), en évacuant ces déchets par l'urine qui est issue de la filtration du plasma sanguin. Le rein permet également d'avoir une quantité constante de minéraux comme le sodium et le potassium et maintient l'équilibre hydrique de l'organisme. Enfin, le rein produit des hormones comme la rénine, indispensable à la régulation de la pression artérielle, des enzymes et des vitamines (vitamine D). Le rein est composé d'une zone corticale en périphérie et d'une zone centrale, la médullaire. La zone corticale contient les unités structurelles et fonctionnelles du rein, les néphrons. La zone médullaire comporte des formations coniques appelées pyramides de Malpighi qui sont composées de tubes collecteurs. Le sommet des pyramides de Malpighi est coiffé par un calice rénal qui recueille l'urine et qui s'ouvre dans le bassinet, ce dernier permettant d'acheminer l'urine jusque dans l'uretère, puis vers la vessie (**Figure 1**).





2. Le néphron : unité fonctionnelle du rein

Chaque rein possède un million de néphrons et chaque néphron est constitué d'un glomérule, dans lequel le sang est acheminé par l'artériole afférente dans un peloton d'anses capillaires glomérulaires afin d'y être filtré à travers la barrière de filtration glomérulaire (BFG) pour former l'urine primitive. Ensuite, les tubules rénaux (tubes proximaux, Anse de Henlé, tubes distaux et canal collecteur) régulent la composition de l'urine par des mécanismes de réabsorption et de sécrétion (**Figures 2** et **Figure 3**).



Figure n°2 : Représentation schématique d'un néphron. Schéma d'après le site web http://Jil.com, Servier Medical Art.

Les néphrons filtrent quotidiennement environ 180 litres de plasma et ne rejettent que 1,5 à 2 litres d'urine. Cette filtration s'effectue grâce à un équilibre entre les pressions hydrostatiques au niveau des capillaires glomérulaires et de la capsule de Bowman. La pression hydrostatique glomérulaire va ainsi permettre au liquide plasmatique et à la plupart des petites molécules de traverser la BFG, mais la taille des pores et les charges négatives de la BFG vont représenter un obstacle efficace au passage des éléments figurés du sang (globules, plaquettes) et des protéines plasmatiques de plus grande taille. À l'inverse, la pression oncotique et la pression hydrostatique de la capsule de Bowman vont retenir le liquide plasmatique empêchant ainsi une filtration totale. L'urine primitive (ou ultrafiltrat) résultant de cette filtration a une composition proche de celle du plasma sanguin, à l'exception de son très faible pourcentage de protéines plasmatiques. La fuite urinaire de protéines de haut poids moléculaire telles que l'albumine, observée au cours des syndromes néphrotiques est le reflet d'une dysfonction de la perméabilité sélective de la BFG (Haraldsson, Nystrom et al. 2008).

La BFG est constituée de trois couches qui sont, dans l'ordre de la filtration glomérulaire : les cellules endothéliales fenestrées, la membrane basale glomérulaire (MBG) et enfin les podocytes. Au sein du glomérule, les capillaires glomérulaires sont soutenus par les cellules mésangiales. L'ensemble de ces structures constitue le floculus glomérulaire qui est entouré par la capsule de Bowman, ellemême bordée sur son versant interne par les cellules épithéliales pariétales (**Figure 3A**). Les podocytes sont des cellules épithéliales hautement différenciées dont les pieds primaires se ramifient en pédicelles et sont reliés entre eux par une jonction intercellulaire unique appelée le diaphragme de fente (Rodewald R & Karnovsky M. J Cell Biol, 1974) (**Figure 3B**).



Figure n°3 : Représentation schématique d'un glomérule d'après Machuca et al., 2009. A.

(A) Le floculus, contenu dans la capsule de Bowman, est constitué des anses capillaires, de la membrane basale glomérulaire, des podocytes et des cellules mésangiales.
 (B) Détail de la BFG qui est constituée de trois couches : l'endothélium fenestré
 (E), la membrane basale glomérulaire (MBG) et les pédicelles des podocytes (P) reliés par le diaphragme de fente (DF).

3. Les différents constituants du glomérule

a) L'endothélium fenestré

Les anses capillaires glomérulaires sont tapissées par un endothélium fenestré qui met en contact le plasma avec la MBG. Cet endothélium possède des larges pores de 50 à 100 nm de diamètre qui permettent le passage de substances comme l'eau, le sodium, l'urée, le glucose et les petites protéines. Les cellules endothéliales sont recouvertes d'une couche superficielle gélatineuse appelée

glycocalyx composée de protéoglycanes et de sialoprotéines qui jouent un rôle important dans la régulation des propriétés de filtration du glomérule (Jeansson and Haraldsson 2003; Singh, Satchell et al. 2007, Salmon, Neal et al. 2009).

b) La membrane basale glomérulaire

La MBG est une membrane basale très particulière car elle est située entre deux types cellulaires : les cellules endothéliales sur son versant interne et les podocytes sur son versant externe (Figure 3 et Figure 4). Elle est deux fois plus épaisse que les membranes basales existant dans d'autres tissus car elle est issue de la fusion, au cours du développement du glomérule, des membranes basales des cellules endothéliales et des podocytes. Elle est composée de trois couches distinctes visibles en microscopie électronique : une zone centrale dense aux électrons appelée lamina densa avec de part et d'autre deux zones minces plus claires appelées lamina rara interna du côté de l'endothélium, et lamina rara externa en contact avec les podocytes (Figure 4). La MBG mature est composée d'isoformes spécifiques des protéines fondamentales des membranes basales: la laminine 11 (α 5 β 2 γ 1), le perlécan (protéoglycane à héparane sulfate), le collagène de type IV, le nidogène et l'agrine (Paulsson 1992).



Figure n°4 : Les différents composants de la barrière de filtration glomérulaire vus en microscopie électronique à transmission (Pavenstädt H et al. 2003).

Les cellules endothéliales fenestrées (EF) et les pédicelles des podocytes (P) sont séparés par la membrane basale glomérulaire (GBM) composée de la lamina densa (LD), la lamina rara interna (LDI) et la lamina rara externa (LDE). Les pédicelles sont reliés entre eux à leur base par le diaphragme de fente (SD).

c) Les cellules mésangiales

Les cellules mésangiales sont les cellules de soutien du glomérule assurant la stabilité du floculus glomérulaire et communiquant avec les podocytes. Insérées entre les capillaires glomérulaires, elles peuvent être en contact direct avec les cellules endothéliales (Kriz, Elger et al. 1990). Elles sont

également liées à la MBG, du côté opposé des podocytes et sont en continuité avec le mésangium extra-glomérulaire situé entre les artérioles afférentes et efférentes (**Figure 3**). Elles synthétisent la matrice mésangiale qui est constituée de collagène de type IV (chaînes α 1 et α 2) et V, de laminines, de fibronectine, de protéoglycanes à chaînes héparane sulfate, de chondroitine sulfate, et de nidogène (Schlondorff and Banas 2009). Les cellules mésangiales ont aussi des propriétés contractiles leur permettant de jouer un rôle dans la régulation de la pression hydrostatique glomérulaire, dans la proportion de surface de filtration disponible et le débit de filtration glomérulaire (Stockand and Sansom 1998).

d) Les podocytes

Le podocyte est une cellule hautement différenciée en forme de pieuvre qui ne prolifère pas en situation physiologique. Le podocyte a un corps cellulaire principal d'où partent des prolongements cytoplasmiques ramifiés qui entourent les capillaires. Ces prolongements ou « pieds » primaires donnent naissance à de fins prolongements secondaires, appelés pédicelles ou pieds des podocytes. Les pédicelles de podocytes adjacents sont étroitement entremêlés recouvrant largement les anses capillaires (**Figure 5**). Au niveau de la membrane basale du podocyte, les espaces entre les pédicelles ou fentes de filtration sont comblés par une mince structure membranaire appelée diaphragme de fente (DF) (**Figure 4**). Le podocyte est une cellule polarisée avec un grand domaine apico-latéral qui représente plus de 90 % de sa surface cellulaire et qui fait face à l'espace urinaire, et un petit domaine membranaire basal attaché sur le versant externe de la MBG. Cette cellule et un grand nombre des protéines spécifiques qu'elle exprime sont extrêmement conservées chez les vertébrés. Des cellules comparables aux podocytes, les néphrocytes, ont également été identifiées chez la drosophile (Zhang, Zhao et al. 2013) soulignant le rôle fonctionnel crucial des podocytes (**cf infra**).



Figure n°5 : Architecture des podocytes dans un glomérule de rat vue par microscopie électronique à balayage (Quaggin and Kreidberg 2008).

Les pieds primaires (P) des podocytes se ramifient en pédicelles (FP) s'enroulant autour des anses capillaires glomérulaires.

B. <u>Le podocyte, cellule clé de la barrière de filtration</u> glomérulaire

1. Les différents domaines membranaires du podocyte

La membrane plasmique des pédicelles du podocytes est divisée en trois domaines connectés au cytosquelette d'actine: un large domaine apical, une partie basale connectant les pédicelles à la membrane basale glomérulaire et le diaphragme de fente reliant les pédicelles adjacents (Kerjaschki et al., 2001) (**Figure 6**). Tous ces domaines assurent chacun une fonction propre relayée par le cytosquelette d'actine qui fait fonction d'organisateur central. Des anomalies de structure dans l'un de ces domaines conduisent donc à une réorganisation active du cytosquelette d'actine, à l'effacement des pédicelles avec perte de leurs interdigitations et disparition du DF (Kerjaschki et al., 2001).



Figure n°6 : Les différents domaines de la membrane des pédicelles (d'après Kerjaschki et al., 2001). La partie basale des pédicelles (rouge) permet leur ancrage à la lamina rara externa (LRE pour lamina rara externa) de la membrane basale glomérulaire. Le diaphragme de fente (DF ou « SD pour slit diaphragm », en bleu) permet l'attachement avec les pédicelles voisins. Le large domaine apical (vert) fait face à la chambre urinaire. L'abréviation LD est pour lamina densa.

a) La diaphragme de fente

Entre les pédicelles de deux podocytes adjacents, il y a une fente étroite qui a une largeur constante de 40 nm. Cette fente contient une membrane ultramince appelée diaphragme de fente (DF ou SD pour « slit diaphragm »). Dès 1974, un modèle de structure du DF en une sorte de « fermeture éclair » a été proposé par Rodewald R. et Karnovsky MJ (Rodewald and Karnovsky, 1974) (**Figure 7**). Dans ce modèle, le DF est un réseau de protéines tridimensionnel avec une structure extrêmement ordonnée et périodique où des ponts forment une fermeture éclair. Ce complexe protéique, dont les pores ont une largeur correspondant à la taille de l'albumine, est dynamique et constitue une barrière physique directe au passage des macromolécules.



Figure n°7 : Le diaphragme de fente.

(A) Diaphragme de fente d'un glomérule de rat, la ligne centrale de la jonction et les filaments croisés sont visibles. (B) Représentation schématique d'un diaphragme de fente. La dimension moyenne de la section d'un pore entre les jonctions est indiquée dans le rectangle. (A) et (B) d'après Rodewald, 1974.

Ce DF est composé de protéines transmembranaires dont le constituant principal est la néphrine, un récepteur de la superfamille des immunoglobulines (Kestilä et al., 1998), qui forme des homodimères sur lesquels s'agencent d'autres molécules comme NEPH1 (« Nephrin-like protein 1»), la cadhérine FAT1 (« Protocadherin Fat1 ») et la P-cadhérine (**Figure 8**). Ces homodimères de protéines transmembranaires interagissent avec des protéines cytoplasmiques ou membranaires telles que la podocine, CD2AP (« CD2 associated protein ») ou encore l' α -actinine 4 qui stabilisent l'ancrage du DF au cytosquelette du podocyte. La plupart de ces protéines sont essentielles au maintien du DF et de la BFG puisque des mutations ou l'inactivation des gènes codant ces protéines sont responsables d'une protéinurie voire d'un syndrome néphrotique (**cf infra**). Le DF a un rôle structural, similaire aux jonctions adhérentes et il est connecté au réseau d'actine (Reiser et al., 2000). Il a également un rôle de plateforme de signalisation, captant les signaux extra-cellulaires et les communiquant en continu au cytosquelette, conférant ainsi au podocyte une formidable plasticité (Kawashi H, 2020).



Figure n°8 : Schéma de la barrière de filtration glomérulaire d'après (Machuca et al., 2009).

Les composants principaux sont la barrière de filtration glomérulaire (GBM pour « Glomerular basement membrane »), le diaphragme de fente (SD pour « slit diaphragm ») et les pédicelles des podocytes (FP pour « foot process ») et endothélium fenestré (E pour « endothelium »).

b) Le domaine apical et basal du podocyte

La partie apicale des podocytes fait face à l'espace urinaire de la capsule de Bowman. Elle contient des protéines chargées négativement qui pourraient constituer une barrière de charge au passage des protéines et participer aux forces électrostatiques répulsives qui maintiennent l'espacement des pédicelles. Parmi ces protéines figurent la podocalyxine et la podoplanine, ainsi que GLEPP-1 (« Glomerular Epithelial Protein 1 ») (**Figure 8**). La partie basale des pédicelles est ancrée à la membrane basale glomérulaire par les dystroglycanes et les intégrines. L'intégrine principale du podocyte est l'intégrine α 3 β 1 qui se lie au collagène, à la fibronectine, à la laminine et au nidogène de la membrane basale glomérulaire d'une part (Cybulsky, Carbonetto et al. 1992), et à la vinculine, la taline ou la paxilline du pédicelle d'autre part, ces dernières étant reliées au cytosquelette d'actine (Drenckhahn, Beckerle et al. 1988; Drenckhahn and Franke 1988).

2. <u>Le cytosquelette du podocyte</u>

L'organisation du cytosquelette du podocyte est essentielle au maintien de son architecture atypique en forme de pieuvre et à sa fonction. Le corps cellulaire et les pieds primaires sont composés majoritairement de microtubules et de filaments intermédiaires. En revanche, le cytosquelette des pédicelles, lié à la MBG par des contacts focaux, est constitué d'un réseau de microfilaments d'actine, de myosine, d' α -actinine, de taline et de vinculine, entre autres. Deux réseaux d'actine sont identifiables dans les pédicelles par microscopie électronique : un anneau cortical d'actine situé sous la membrane plasmique (« cortical actin ») et un réseau d'actine « en paquet » (« actin bundle ») localisé dans la partie centrale du cytoplasme (Ichimura et al., 2003) (**Figure 9**). Ce réseau de filaments extrêmement dynamique permet des remaniements rapides. Ainsi, il a été montré dès 1974 que l'injection de sulfate de protamine chez le rat induit un effacement des pédicelles qui reprennent leur forme d'origine en quelques minutes lorsque la protamine est enlevée (Seiler et al., 1975).



Figure n°9 : Section d'un pédicelle (à gauche) et représentation schématique de l'organisation des filaments d'actine du pédicelle (à droite) (Ichimura et al., 2003).

L'actine « condensée » (flèche à gauche et AB à droite pour « actin bundle ») est localisée dans la portion centrale du cytoplasme et le réseau d'actine corticale (* à gauche et CAN à droite pour « cortical actin network ») est à la périphérie de la cellule. Les abréviation sont En : cellule endothéliale, GBM: membrane basale glomérulaire et SD: diaphragme de fente.

II. Le syndrome néphrotique

Le syndrome néphrotique (SN) est caractérisé par une protéinurie sélective massive (supérieure à 50 mg/kg/j chez l'enfant, 3 g/j chez l'adulte) responsable d'une hypoalbuminémie (< 30 g/l), d'une hyperlipidémie et d'un effacement des pédicelles visible en microscopie électronique. Il s'accompagne d'œdèmes liés à la perte des protéines et à la mauvaise réabsorption de l'eau et des sels. Le SN idiopathique (SNI) représente près de 90 % des néphropathies d'origine glomérulaire de l'enfant (incidence annuelle estimée à 2-3/100 000 enfants) et 15 à 20 % de celles de l'adulte (Golay et al., 2017). Le SN est la conséquence d'une anomalie de la BFG qui peut être primaire ou secondaire à des infections parfois congénitales, au diabète, à la néphropathie liée au VIH, à certains médicaments et aux anomalies génétiques, entre autres. En fonction de l'âge des premiers symptômes, les SN sont

dits congénitaux (s'ils débutent entre la naissance et l'âge de 3 mois), infantiles (s'ils débutent entre 3 mois et un an), juvéniles ou de l'adulte (Hinkes, Mucha et al. 2007).

A. Aspects anatomiques

En microscopie électronique, la lésion constante des podocytes est un effacement diffus des pédicelles avec disparition des diaphragmes de fente. Les pédicelles adjacents se rétractent, s'épaississent et se raccourcissent ce qui leur donne un aspect continu en bordure de la membrane basale glomérulaire. Ce phénomène fait intervenir un remaniement dynamique du cytosquelette du podocyte (**Figure 10**).



Figure n°10 : Effacement des pédicelles vu en microscopie électronique (d'après Takeda et al., 2001). (A) BFG d'aspect normal avec des pédicelles individualisés et séparés par un DF. (B) Effacement des pédicelles et disparition du DF. Les abréviations sont BM pour membrane basale, fp pour pédicelle, Ep pour effacement des pédicelles et En pour endothélium. Échelle : 0,5 μm.

En microscopie optique, trois types de lésions peuvent être observées : 1) les lésions glomérulaires minimes (LGM) qui sont des lésions discrètes des glomérules qui apparaissent normaux, 2) la hyalinose segmentaire et focale (HSF) qui se définit comme une lésion touchant un segment particulier du glomérule (segmentaire) dans seulement certains glomérules (focale) et 3) la sclérose mésangiale et diffuse (SMD) qui se caractérise par une expansion du mésangium, une accumulation de matrice extracellulaire et une hypertrophie et une hyperplasie des podocytes qui ont un aspect en couronne (lésion très sévère, qui touche l'ensemble du glomérule) (**Figure 11**) (Barisoni et al., 2007).



Figure n°11 : Eventail des lésions glomérulaires causées par le SNI (adapté de Barisoni, 2007). Photos des glomérules fournies par MC Gubler. (A) Glomérule normal (x400). (B) Lésions glomérulaires minimes (LGM) (x400). (C) Hyalinose segmentaire et focale (HSF) (x400). (D) Sclérose mésangiale diffuse (SMD) (x400).

B. <u>Réponse à la cortico-thérapie</u>

La corticothérapie représente le traitement de première intention du SNI et permet de classer les SN en deux catégories, l'évolution de la maladie étant fonction de la réponse aux corticoïdes.

Dans la majorité des cas, le traitement est efficace définissant le syndrome néphrotique corticosensible (SNCS) qui représente 80-90 % des SNI de l'enfant avec une incidence annuelle de 1 à 1,5 sur 50 000 contre de 1 sur 300 000 chez les adultes (Orphanet, 2007). Bien que ces formes soient de bon pronostic, (Dossier et al., 2017), 40 % des patients souffrent de rechutes fréquentes (la protéinurie réapparait) et/ou d'une dépendance aux corticoïdes (cortico-dépendants) et doivent alors bénéficier de traitements alternatifs (Golay et al., 2017). Les lésions le plus fréquemment observées dans les SNCS sont des lésions de type LGM. La physiopathologie du SNI reste mal comprise mais l'hypothèse la plus communément admise est la présence d'un facteur circulant jusqu'à présent non identifié, responsable de l'augmentation de la perméabilité de la BFG. Plusieurs facteurs interviendraient : les lymphocytes T et une cascade de cytokines, les lymphocytes B, et le podocyte dont le rôle est central (Kaneko et al., 2015). La persistance de la protéinurie sous corticothérapie définit le SN cortico-résistant (SNCR) qui représente environ 10 % des SNI (Kim et al., 2005), dont 30-40 % évoluent vers l'insuffisance rénale terminale (IRT) (Mekahli, Liutkus et al. 2009) nécessitant la mise en œuvre d'un programme de dialyse-transplantation. En histologie, si des lésions LGM peuvent être observées sur les biopsies précoces, des lésions de HSF sont majoritairement observées et apparaissent de façon systématique au cours de l'évolution de la maladie. Plus de la moitié des patients résistants à la corticothérapie ne récidive pas après transplantation suggérant que le défaut primitif est une anomalie de structure du filtre glomérulaire ce qui expliquerait la résistance à la corticothérapie. Une partie de ces SNCR est due à des anomalies intrinsèques du podocyte d'origine génétique, c'est-à-dire à des mutations de gènes codant des protéines podocytaires essentielles à la structure et au fonctionnement de la BFG (**cf infra**).

III. Les podocytopathies héréditaires

Au cours de ces dernières années, l'étude des formes héréditaires de SN et de protéinurie familiale ou de hyalinose segmentaire et focale HSF (en référence à la lésion glomérulaire observée principalement dans ces formes) a permis de définir un nouveau groupe de pathologies baptisées podocytopathies. La majorité des podocytopathies héréditaires implique des SNCR.

A. Mode de transmission et caractéristiques cliniques

La variabilité observée dans l'âge d'apparition de la protéinurie/SN, le type de lésions et le mode de transmission de la maladie permettent de définir plusieurs groupes de malades. Ainsi, les formes de SNCR de transmission autosomique récessive (AR) sont les formes majoritaires. Elles touchent principalement les enfants, avec une protéinurie apparaissant généralement dans les premières années de vie, voire à la naissance comme dans le syndrome néphrotique congénital de type finlandais (dû à des mutations du gène *NPHS1* codant la néphrine). L'évolution de la maladie vers l'IRT est rapide. A l'inverse, les formes de transmission autosomique dominante (AD), également appelées protéinurie familiale ou de hyalinose segmentaire et focale (HSF) (en référence à la lésion glomérulaire la plus fréquente dans ces formes) sont beaucoup plus rares. La protéinurie apparait généralement à l'adolescence ou à l'âge adulte et la maladie présente une évolution plus lente vers l'IRT.

B. Aspects moléculaires des podocytopathies

Les études génétiques de ces formes familiales de podocytopathies, ainsi que des nombreux modèles murins génétiquement modifiés ont permis d'identifier de nombreux gènes codant des protéines podocytaires (**Tableau 1 et Figure 12**) et de préciser la structure et le fonctionnement de la BFG. Ces gènes peuvent être classés en deux catégories: 1) ceux codant des protéines structurales du DF ou impliquées dans la régulation et la dynamique des réseaux d'actine et de microtubules, et 2) ceux codant des protéines de fonctions très variées comme des facteurs de transcription, des protéines mitochondriales et lysosomales, des enzymes ou encore des protéines impliquées dans l'endocytose (Preston et al., 2019).

Les deux premiers gènes dont les mutations étaient responsables de la majorité des SNCR de transmission AR codent deux protéines structurales du podocyte localisées au niveau du DF: la néphrine, codée par le gène *NPHS1* (Kestilä et al., 1998), un récepteur transmembranaire de la famille des immunoglobulines et l'un des composants majeurs du DF, et la podocine, codée par le gène *NPHS2* identifié dans le laboratoire (Boute et al., 2000), ancrée à la membrane plasmique du côté cytoplasmique et interagissant avec la néphrine. Les gènes retrouvés majoritairement mutés dans les formes AD sont : 1) ACTN4 qui code l' α -actinine 4, une protéine de la superfamille des spectrines qui se lie aux filaments d'actine (Kaplan et al., 2000), 2) TRPC6 (« short Transient Receptor Potential Channel 6 ») qui code un transporteur du calcium exprimé à la membrane plasmique des podocytes (Winn et al., 2005), et 3) INF2 (« INverted Formin 2 ») codant une protéine impliquée dans la polymérisation/dépolymérisation des filaments d'actine (Brown et al., 2010 ; Boyer et al., 2011). Le gène INF2 est le plus fréquemment retrouvé muté dans les formes AD.

Nature et fonction	Gène	Protéine	Phénotype	Mode de transmission	Référence
	NPHS1	Néphrine	NPHS1	AR	Kestilä et al. 1998
	NPHS2	Podocine	NPHS2	AR	Boute et al. 2000
	CD2AP	CD2-associated protein	FSGS3	AD/AR	Kim et al., 2003
	TRPC6	Transient receptor potential channel 6	FSGS2	AD	Winn et al. 2005
	PLCE1	Phospholipase C, ε1	NPHS3	AR	Hinkes et al. 2006
Protéines du DF	FAT1	Protocadherin Fat 1	NPHS (association à confirmer)	AR	Gee et al., 2016
	MAGI2	Membrane-associated guanylate kinase 2	NPHS15	AR	Bierzynska et al., 2017
	KIRREL1	Nephrin-like protein 1	NPHS	AR	Solanki et al., 2019
	Z0-1	Zonula occludens-1			
Protéines liées	ACTN4	α-actinin-4	FSGS1	AD	Kaplan et al. 2000
au cytosquelette d'actine	INF2	Inverted formin-2	FSGS5; La maladie de Charcot-Marie- Tooth	AD	Brown et al., 2010b Boyer et al., 2011

	МҮН9	Non-muscle myosin heavy chain IIA	Macrothrombocyt openia and granulocyte inclusions with or without nephritis or sensorineural hearing loss	AD	Seri et al. 2000
	MYO1E	Myosin IE	FSGS6	AR	Mele et al., 2011
	ARHGDIA	Rho GDP-dissociation inhibitor α1	NPHS8	AR	Gupta et al., 2013
	ARHGAP24	Rho GTPase-activating protein 24	FSGS (association à confirmer)	AD	Akilesh et al., 2011
	ANLN	Anillin	FSGS8	AD	Gbadegesin et al., 2014
	KANK2	KN motif and ankyrin repeat domain-containing protein 2	NPHS16	AR	Gee et al., 2015
	KANK1	KN motif and ankyrin repeat domain-containing protein 1	NPHS (association à confirmer)	AR	Gee et al., 2015
	KANK4	KN motif and ankyrin repeat domain-containing protein 4	NPHS (association à confirmer)	AR	Gee et al., 2015
	WDR73	WD repeat containing protein 73	GAMOS	AR	Colin et al,2014
	LAMB2	Laminin subunit β2	Syndrome de Pierson; NPHS5	AR	Zenker et al., 2004
	ITGA3	Integrin- α3	Epidermolyse bulleuse jonctionnelle avec atteinte respiratoire et rénale	AR	Has et al., 2012
	ITGB4	Integrin-β4	Epidermolyse bulleuse	AR	Kambham et al., 2000
Protéines d'adhésion et de la MBG	CD151	Tetraspanin	Néphropathie avec epidermolyse bulleuse et surdité	AR	Karamatic et al., 2004
	COL4A3	Collagen (IV) α3	Syndrome d'Alport; Hématurie	AD/AR	Badenas et al., 2002
	COL4A4	Collagen (IV) α4	Syndrome d'Alport; Hématurie	AD/AR	Jefferson et al., 1997
	COL4A5	Collagen (IV) α5	Syndrome d'Alport	XD	Barker et al., 1990
	EMP2	Epithelial membrane protein 2	NPHS10	AD/AR	Gee et al., 2014
Protéines nucléaires et facteur de	WT1	Wilms' tumor protein	Syndrome de Denys-Drash; Syndrome de Frasier; NPHS4		Jeanpierre et al., 1998
transcription	LMX1B	LIM homeobox transcription factor 1-β	Syndrome Nail- patella	AD	Dreyer et al., 1998

	SMARCAL1	HepA-related protein	Dysplasie immuno-osseuse de Schimke	AR	Boerkoel et al., 2002
	PAX2	Paired box gene 2	Syndrome rein- colobome ; FSGS7	AD	Barua et al., 2014
	MAFB	Transcription factor MafB	Syndrome de l'ostéolyse carpo- tarsienne multicentrique	AD	Zankl et al., 2012
	LMNA	Lamin A/C	Familial partial lipodystrophy	XD	Javor et al., 2004
	GATA3	GATA binding protein 3	Hypoparathyroidis me, sourdité, et dysplasia rénale	AD	Esch et al., 2000
	NUP93	Nuclear pore complex protein Nup93	NPHS12	AR	Braun et al. 2016
	NUP205	Nuclear pore complex protein Nup205	NPHS13 (association à confirmer)	-	Braun et al.
	XPO5	Exportin-5	NPHS (association à confirmer)	-	Braun et al.
	NUP85	Nuclear pore complex protein Nup85	NPHS18	AR	Braun et al. 2018
	NUP160	Nuclear pore complex protein Nup160	NPHS19 (association à confirmer)	AR	Braun et al. 2018
	COQ2	4-hydroxybenzoate polyprenyltransferase	Déficience primaire de CoQ10 1	AR	Quinzii et al., 2006
Protéines mitochondriales	COQ6	Ubiquinone biosynthesis monooxygenase COQ6	Déficience primaire de CoQ10 6	AR	Heeringa et al., 2011
	PDSS2	Decaprenyl-diphosphate synthase subunit 2	Déficience primaire de CoQ10 6	AR	López et al., 2006
	MTTL1	Mitochondrially encoded tRNA leucine 1 (UUA/G)	Syndrome MELAS	ADN mt maternel	Yasukawa et al., 2000

Tableau n°1 : Gènes mutés dans les podocytopathies.

Les abréviations sont AR pour autosomique récessif, AD pour autosomique dominant, mt pour mitochondrial et XD pourdominant sur l'X.



Figure n°12 : Représentation schématique de la nature, fonction et localisation dans les pédicelles des différentes classes de protéines mutées dans les podocytopathies (adapté d'un collègue G. Dorval).

La majorité de ces podocytopathies héréditaires sont non syndromiques (atteinte rénale isolée) mais il existe des rares formes syndromiques où l'atteinte rénale s'associe à divers symptômes extra-rénaux, le plus souvent des anomalies neurologiques, comme dans le cas du syndrome de Galloway-Mowat.

C. Le syndrome de Galloway-Mowat (GAMOS)

1. <u>Aspects cliniques et anatomopathologiques</u>

Le syndrome de Galloway-Mowat (GAMOS) est une pathologie rare de transmission autosomique récessive caractérisée par l'association d'un SNCR, d'une microcéphalie et d'anomalies du système nerveux central (SNC). Depuis sa première description par Galloway et Mowat en 1968 (Galloway and Mowat, 1968), de nombreux rapports de patients et des études de petites séries décrivent leurs caractéristiques cliniques et histopathologiques révélant ainsi la grande hétérogénéité clinique du GAMOS. Une constante majeure du GAMOS est la microcéphalie détectée en majorité à la naissance (microcéphalie primaire) mais qui peut aussi se développer de façon post-natale (microcéphalie secondaire). Les anomalies cérébrales majeures observées sont une atrophie corticale et des défauts de gyration (sillons du cortex cérébral) comme l'agyrie, la microgyrie ou la polymicrogyrie, des défauts de myélinisation et une atrophie cérébelleuse. Ces défauts structurels du SNC sont associés dans la moitié des cas à une déficience intellectuelle sévère, une hypotonie et des convulsions. En ce qui concerne l'atteinte rénale, elle varie de la protéinurie isolée à un SNCR qui progresse rapidement vers l'insuffisance rénale terminale (IRT) au bout de quelques mois. Cependant, bien que le SN soit détecté habituellement dans les premiers mois de vie, un petit nombre de patients présente une apparition tardive au cours de l'enfance (44-198 mois) (Steiss et al., 2005), voire aucun signe d'atteinte rénale (Colin et al., 2014; Jinks et al., 2015). L'analyse des biopsies rénales révèle des lésions de type LGM, des lésions de HSF parfois de type « collapsing », ou une SMD, sans dépôts significatifs d'immunoglobulines. Le pronostic de cette maladie est sévère et la plupart des enfants meurent avant l'âge de 6 ans.

2. Aspects moléculaires

L'hétérogénéité clinique du GAMOS est le reflet de son hétérogénéité génétique avec 10 gènes porteurs de mutations identifiés jusqu'à aujourd'hui, dont 7 par notre groupe (**Tableau 2**). Le premier gène identifié comme impliqué dans le GAMOS est *WDR73* dont des mutations ont été identifiées dans un sous-groupe de patients présentant les mêmes caractéristiques cliniques, en particulier une atrophie du cervelet très sévère. Ce gène code la protéine WDR73 qui jouerait un rôle crucial dans la survie cellulaire, la prolifération, le maintien de l'architecture cellulaire et de la fonction normale des neurones et des podocytes, ainsi que dans le développement et la maturation du système nerveux (Colin et al., 2014; Ben-Omran et al., 2015; Jinks et al., 2015; Vodopiutz et al., 2015; Jiang et al., 2017). Puis, des mutations ont été identifiées dans des gènes codant pour des protéines impliquées dans le métabolisme de l'ARNt, tels que WDR4 (Braun et al., 2018), et les composants du complexe KEOPS (Kinase, Endopeptidase et autres protéines de petite taille) ainsi que l'enzyme YRDC qui font partie de la voie de biosynthèse de la modification t6A des ARN de transfert (Braun et al., 2017a; Arrondel et al., 2019). Les mutations dans les gènes codant des composants des pores nucléaires, les nucléoporines NUP107 (Rosti et al., 2017) et NUP133 (Fujita et al., 2018) sont également connues pour être à l'origine d'un GAMOS.

Gène	Protéine	Mode de transmission	Phénotype	Références
Voie de bio	synthèse du t ⁶ A		•	
LAGE3	L antigen family member 3	lié à l'X	GAMOS2	Braun et al. 2017
OSGEP	O-sialoglycoprotein endopeptidase	AR	GAMOS3	Braun et al. 2017
TP53RK	TP53 regulating kinase	AR	GAMOS4	Braun et al. 2017
TPRKB	TP53RK binding protein	AR	GAMOS5	Braun et al. 2017
GON7	GON7 subunit of KEOPS complex	AR		Arrondel et al. 2019
YRDC	yrdC N6-threonylcarbamoyltransferase domain containing	AR		Arrondel et al. 2019
Autres	·	•		
WDR73	WD repeat domain 73	AR	GAMOS1	Colin et al. 2014
WDR4	WD repeat domain 4	AR	GAMOS6	Braun et al. 2018
NUP107	Nucleoporin 107	AR	GAMOS7	Rosti et al. 2017
NUP133	Nucleoporin 133	AR	GAMOS8	Fujita et al. 2018

Tableau n°2 : Liste des gènes mutés dans le GAMOS.

3. Le complexe KEOPS

La thréonylcarbamoylation de l'adénine en position 37 des ARNt spécifiques des codons ANN (t⁶A) est une modification post-transcriptionnelle nécessaire à l'initiation de la traduction ainsi qu'à son efficacité. Cette modification se déroule en deux étapes : la protéine YRDC synthétise d'abord un intermédiaire thréonylcarbamoyl (TC)-AMP, puis le groupement thréonylcarbamoyl est transféré sur l'ARNt par le complexe KEOPS très conservé au cours de l'évolution (**Figure 13**). Le complexe humain contient 5 sous-unités GON7, LAGE3, OSGEP, TP53RK et TPRKB (Downey et al., 2006; Wan et al., 2016). L'étude de la structure atomique de ce complexe a révélé que les cinq protéines sont organisées de façon linéaire (Hecker et al., 2008; Mao et al., 2008; Zhang et al., 2015) (**Figure 14**).



Figure n°13. Représentation de la voie de biosynthèse de la modification t⁶*A.* (A) Voie de biosynthèse du t6A par l'enzyme YRDC et le complexe KEOPS. (B) Structure chimique de la base modifiée à côté de la boucle anti-codon de l'ARNt (adapté de Perrochia et al., 2013).

Récemment, le laboratoire a identifié des mutations dans les 5 gènes codant les sous-unités KEOPS et dans le gène codant l'enzyme YRDC chez des patients atteints de GAMOS (Braun et al., 2017; Arrondel et al., 2019). Des études fonctionnelles *in vitro* et *in vivo* de ces mutations ont conduit à l'identification d'altérations dans de multiples processus cellulaires, tels que la prolifération, l'apoptose, la migration et la traduction des protéines. De plus, le niveau de synthèse de t⁶A est diminué dans les cellules exprimant les mutations retrouvées chez les patients. De manière intéressante, les mutations identifiées dans le gène *GON7* conduisent à une forme plus atténuée du GAMOS. OSGEP est la sous-unité catalytique du complexe KEOPS, cependant le rôle des 4 autres protéines reste à élucider, en particulier le rôle de GON7, la 5^{ème} sous-unité du complexe récemment découverte (Wan et al., 2017).



Figure n°14 : Représentation schématique du complexe KEOPS.

Modèle du complexe KEOPS de levure basé sur les structures cristallines des sous-complexes. Les gènes humains GON7, LAGE3, OSGEP, TP53RK et TPRKB sont les orthologues des gènes Gon7, Pcc1, Kae1, Bud32 et Cgi121 chez la levure d'après Zhang et al., 2015.

IV. <u>Outils pour modéliser les syndromes néphrotiques</u> <u>héréditaires</u>

L'étude des anomalies héréditaires des composants de la BFG, en particulier des protéines spécifiques du podocyte, est limitée dans les modèles cellulaire *in vitro* du fait de la complexité de cette structure comportant différents types cellulaires. L'utilisation de modèles animaux *in vivo* s'avère donc complémentaire aux études *in vitro* pour modéliser les podocytopathies héréditaires et étudier les différents processus cellulaires intervenant en conditions normales et pathologiques.

A. <u>Le modèle de la drosophile</u>

Les avantages du modèle drosophile (Drosophila melanogaster), ou communément appelé mouche à fruit ou mouche du vinaigre, sont des cycles de vie et de reproduction courts et la disponibilité de nombreux outils génétiques. A 25°C, le cycle de vie de la drosophile est de 10 jours, comprenant trois stades larvaires, puis la transformation en pupe au septième jour (**Figure 15**).



Figure n°15 : Cycle de vie des Drosophile (adapté du site : https://mantispassion.com/2017/09/21/les-drosophiles/)

La drosophile est un insecte dont le système excréteur présente des similitudes cytologiques, moléculaires et fonctionnelles avec celui des mammifères (Denholm and Skaer, 2009; Helmstädter and Simons, 2017; Marelja and Simons, 2019). Le système excréteur chez la drosophile est constitué des tubes de Malpighi et des néphrocytes. Le tube Malpighien qui régule la balance hydrique et ionique, correspond à la partie distale du néphron chez les mammifères. Le néphrocyte filtre les macromolécules de l'hémolymphe (équivalent du sang chez la drosophile) puis réabsorbe par endocytose les macromolécules filtrées, ce qui correspond au rôle chez les mammifères du glomérule et du tube proximal. Les néphrocytes sont des cellules sphériques qui comportent des invaginations de la membrane qui forment à la fois des canaux labyrinthiques et des pédicelles semblables aux invaginations présentes chez le podocyte des mammifères. De plus, la structure du diaphragme néphrocytaire des néphrocytes est analogue à celle du DF des podocytes (**Figure 16**).





Chez la larve au 2^{ème} et 3^{ème} stade, il existe des néphrocytes appelés « néphrocytes en guirlande ou Garland Nephrocytes» (NG) organisés en « collier de perles » autour de l'œsophage au-dessus du proventricule (PV), et des néphrocytes appelés néphrocytes péricardiques (NP) alignés de part et d'autre du cœur de la drosophile au niveau de l'abdomen (**Figure 17**). Les NG sont les seules cellules ayant un rôle de filtration au stade embryonnaire. Aux stades larvaires et adulte, les néphrocytes péricardiques jouent un rôle majeur dans la filtration (Zhang and Chen, 2014).



Figure n°17 : Localisation des néphrocytes chez la larve (Denholm and Skaer, 2009) et la mouche adulte.
(A) Localisation des néphrocytes chez la larve. Les abréviations sont NGs pour néphrocytes de Garlands, oe pour œsophage.
Les structures en bleues correspondent aux tubes de Malpighi. (B) Localisation des néphrocytes chez la mouche adulte. Les abréviations sont PV pour proventricule et NPs pour néphrocytes péricardiques.

De nombreuses protéines du DF chez l'homme comme NEPH1 (KIRREL), la néphrine (NPHS1), ZO-1 et la podocine (NPHS2) ont des orthologues chez la drosophile, « Kind of ire » (Kirre), « Stick and stone » (Sns), « Polychaetoid » (Pyd) et Mec-2 respectivement. Plusieurs études ont montré que ces gènes étaient exprimés par les néphrocytes renforçant ainsi les similitudes entre néphrocytes et podocytes (Zhuang et al., 2009; Helmstädter et al., 2012) (**Figure 18**). Les orthologues des gènes mutés dans les SN héréditaires sont détaillés dans le **Tableau 3**.



Figure n°18: Schéma de comparaison des composants moléculaires des DF des podocytes et des néphrocytes (Millet-Boureima et al., 2018).

Mammifère	Drosophile		
Nom	Gène	Nom	Gène
Néphrine	NPHS1	stick and stone	Sns
Podocine	NPH52	/	Mec-2
CD2-associated protein	CD2AP	CIN85 and CD2AP related	Cindr
Transient receptor potential channels	TRPC6	transient receptor potential-like	Trpl
Phospholipase C Epsilon 1	PLCE1	Phospholipase C at 21C	Plc21C
Protocadherin Fat 1	FAT1	FAT	FAT1
Membrane-associated guanylate kinase inverted 2	MAGI2	/	Magi
Kind of IRRE-like	KIRREL ou NEPH1	Kind of irre	Kirre

Tableau n°3 : Orthologues chez la drosophile des gènes mutés dans les SNCR (d'après le site https://flybase.org/).
Le modèle de la drosophile a été utilisé pour reproduire et comprendre le développement de différentes pathologies rénales comme la lithase rénale (Chung and Turney, 2017), la polykystose rénale (Gamberi et al., 2017) et en particulier pour ce qui nous intéresse le plus les SNCR. En effet, il est possible d'utiliser différents rapporteurs pour évaluer le bon fonctionnement des néphrocytes. Zhang et al. ont montré que les néphrocytes de drosophile peuvent absorber les protéines fluorescentes sécrétées dans l'hémolymphe, permettant ainsi d'évaluer la fonction de filtration/endocytose des néphrocytes in vivo. Ils ont donc généré une lignée transgénique exprimant une protéine fluorescente sécrétée et l'ont croisée avec une lignée transgénique permettant d'inactiver un gène « cible » spécifiquement dans les néphrocytes grâce à un promoteur spécifique des néphrocytes, permettant ainsi d'identifier des gènes nécessaires au bon fonctionnement des néphrocytes (Zhang et al., 2013). Ceci est possible dans la drosophile grâce au système UAS-GAL4, largement utilisé chez la levure. Ce système permet la synthèse de la protéine Gal4 grâce à un promoteur ubiquitaire ou spécifique d'un tissu. Par exemple, les promoteurs de la tubuline ou du gène Dautherless peuvent être utilisés pour une expression ubiquitaire du transgène (noté tub> ou da>). Pour une expression spécifique dans les néphrocytes, le promoteur du gène Dorothy est utilisé (noté dot>). La protéine Gal4 va reconnaître spécifiquement les séquences activatrices (séquences UAS) en amont du gène d'intérêt (Figure 19-A) ou du siARN (Figure 19-B) et activer sa transcription (Brand and Perrimon, 1993).





(A) Exemple d'utilisation du système UAS-Gal4 pour exprimer un transgène X, (B) pour exprimer un siARN X.

De cette façon, des expériences de « sauvetage » peuvent être réalisées : en effet, si l'inactivation chez la drosophile d'un gène spécifiquement dans les néphrocytes (ou dans toutes les cellules de la drosophile grâce à un promoteur ubiquitaire) conduit à un phénotype « mutant », il est possible de réexprimer la forme sauvage (WT) ou mutée de ce gène pour voir si le phénotype redevient « sauvage ». Cela permet de montrer si une mutation induit une perte de fonction totale ou partielle de la protéine et donc de valider la pathogénicité de cette mutation (Helmstädter et al., 2017). De la même manière, deux gènes peuvent être inactivés par un siARN avec une ré-expression de la forme sauvage ou mutée de l'un des deux gènes. Cela permet de tester la synergie entre ces deux gènes car s'ils interagissent ensemble une aggravation du phénotype sera observée. Des expériences d'immunofluorescence (IF) et de microscopie électronique peuvent également être réalisées pour visualiser l'intégrité des néphrocytes ainsi que l'ultrastructure du diaphragme de fente (Helmstädter et al., 2017; Hermle et al., 2017).

B. Les modèles murins

Le modèle murin est utilisé depuis des décennies et a permis de faire des découvertes majeures dans la physiologie rénale (Wharram et al., 2000) en reproduisant parfois de façon fidèle des pathologies rénales comme l'insuffisance rénale aiguë (Bao et al., 2018), les maladies rénales chroniques (Bao et al., 2018; Ueda et al., 2016) ainsi que des SNCR. En effet, de nombreux modèles murins ont été générés pour modéliser différentes formes de SN de transmission AD et AR. Pour les SNCR AR par exemple, des souris déficientes pour le gène Nphs1 présentent une protéinurie massive dès la naissance avec un effacement des pédicelles visible en microscopie électronique et meurent dans les 24h après leur naissance (Putaala et al., 2001). Des modèles de souris déficients respectivement pour les gènes Nphs2 et Cd2ap ont également été créés dans les années 2000. Par exemple, les souris invalidées pour le gène Nphs2 de façon constitutionnelle (knock-out) développent une protéinurie massive une semaine après leur naissance et décèdent 15 jours après. Elles présentent également des lésions de SMD des glomérules à 7 jours ainsi qu'un effacement diffus des pédicelles (Roselli et al., 2004). Pour pallier ce problème de mort précoce empêchant toutes études, des modèles d'inactivation conditionnelle ont été générés pour la podocine permettant d'inactiver le gène à l'âge adulte (Mollet et al., 2009). Les souris déficientes pour CD2AP présentent un SN avec un effacement des pédicelles et une hyperplasie des cellules mésangiales. Elles ont également une protéinurie massive à 3 semaines et décèdent à 7 semaines d'une insuffisance rénale (Shih et al., 1999). Des modèles ont également été générés pour modéliser des formes AD liées à des mutations des gènes ACTN4 et TRPC6. Ainsi, les souris délétées à l'état homozygote pour Actn4 présentent une HSF dès 4 semaines avec un effacement des pédicelles visible en microscopie électronique (Kos et al., 2003). Les deux autres modèles de knock-in ont été générés c'est-à-dire que les souris expriment une forme mutée de l'ACTN4 p.K256E à l'état hétérozygote ou homozygote. Les souris ACTN4 p.K256E homozygotes présentent un effacement des pédicelles dès 12 semaines, alors que les souris hétérozygotes pour la mutation ACTN4 p.K256E présentent des défauts visibles entre 27 et 60 semaines (Henderson et al., 2008). Deux modèles murins ont également été réalisés pour le gène TRPC6 pour les mutations conduisant aux variations protéiques TRPC6 p.P111Q et TRPC p.E896K, reproduisant un phénotype similaire à celui présent chez les patients. Les souris, âgées de 5 à 9 mois, présentent des lésions glomérulaires avec effacement des pédicelles (Krall et al., 2010).

Cependant certains modèles murins ne reproduisent pas exactement la pathologie retrouvée chez l'homme. C'est le cas pour un modèle de souris portant la variation protéique INF2 p.R218Q qui a été créé en 2016. Ces souris âgées de 15 semaines ne présentent pas de phénotype clair à l'état hétérozygote ou homozygote (Subramanian et al., 2016). De plus, un modèle murin a été créé en 2005 pour le gène *NPHS3*, cependant les souris ne développent pas de pathologie rénale mais une maladie cardiaque (Wang et al., 2005).

OBJECTIFS GÉNÉRAUX

Durant mes trois années à l'EPHE, j'ai pu participer à deux projets de recherche : tout d'abord, l'identification de deux nouveaux gènes impliqués dans les SN héréditaires grâce au modèle de la drosophile pendant ma première année. Puis durant mes deux dernières années, j'ai étudié, dans un modèle cellulaire *in vitro* et dans des modèles murins *in vivo*, un complexe très conservé qui catalyse une modification post-transcriptionnelle des ARN de transfert (ARNt) et qui est altéré dans le GAMOS.

Identifier la cause génétique d'une pathologie est primordial pour en comprendre l'origine dans l'espoir d'établir une stratégie thérapeutique précoce. Il est de plus en plus admis que la cause d'une maladie génétique peut être due à des mutations dans plusieurs gènes simultanément (maladies multilocus) (Posey et al., 2017). L'enjeu est de discriminer la contribution de chaque mutation dans le développement de la pathologie. Nous nous sommes donc intéressés à une famille consanguine dont les individus présentent une microcéphalie, un retard mental, des défauts cardiaques et rénaux ainsi qu'une dysmorphie faciale. Le séquençage de l'exome (whole exome sequencing, WES) des patients, a permis d'identifier deux mutations homozygotes faux sens dans deux gènes différents (*ADD3* et *KAT2B*) codant respectivement l'*Adducine y* et la *Lysine Acety/Transferase 2B*. L'enjeu de ce projet est de comprendre la contribution des gènes *ADD3* et *KAT2B* dans le phénotype observé chez les patients.

Actuellement des mutations récessives dans 10 gènes ont été rapportées dans la littérature chez des patients présentant un GAMOS, dont 7 par le laboratoire (Colin et al., 2014; Braun et al., 2017; Rosti et al., 2017; Arrondel et al., 2019). De façon surprenante, 4 de ces gènes (OSGEP, LAGE3, TP53RK et TPRKB) codent les membres dule complexe « Kinase, Endopeptidase and Other Proteins of Small Size » (KEOPS), impliqué dans une modification post-transcriptionnelle universelle, la thréonylcarbamoylation de l'azote N6 de l'adénosine en position 37 (t⁶A) des ARNt qui reconnaissent les codons ANN sur les ARN messager (ARNm) (El Yacoubi et al., 2011). Cette fonction est particulièrement intéressante car il a été montré que les modifications post-transcriptionnelles sur les ARNt ont un rôle dans l'initiation, l'efficacité et la fidélité de la traduction (Perrochia et al., 2013). Tous les patients mutés dans ces 4 gènes présentent une forme très sévère de GAMOS, associant microcéphalie congénitale et atteinte rénale précoce. Dans tous les cas, au moins une des mutations est une mutation hypomorphe. Afin de mieux comprendre les différentes interactions entre les membres du complexe, nous avons étudié le temps de demi-vie de deux membres du complexe LAGE3 et GON7. En parallèle, afin d'étudier ce complexe par une approche in vivo, nous avons créé deux modèles de souris portant la variation protéique Osgep p.R325Q et Lage3 p.F137S grâce à la technique CRISPR/Cas9. Puis par la suite, un modèle de souris Osgep p.R325Q/KO Ex4.

Je vais vous présenter en deux parties successives mon implication dans ces projets dont vous trouverez les articles en annexes.

36

1^{ÈRE} PARTIE : ÉTUDES FONCTIONNELLES DE DEUX GÈNES CANDIDATS DE SYNDROME NÉPHROTIQUE HÉRÉDITAIRE CHEZ LA DROSOPHILE

A. <u>Contexte</u>

Deux variants faux sens homozygotes potentiellement pathogènes dans deux gènes candidats, *ADD3* (c.1975G>C, p.E659Q) et *KAT2B* (c.920T>C, p.F307S), codant respectivement l'*Adducine* γ et la *Lysine AcetylTransferase 2B* ont été identifié par séquençage d'exome chez une famille consanguine avec trois enfants présentant un SNCR, une microcéphalie, un retard de développement, une cataracte et une cardiomyopathie (**Figure 20**). Ces deux gènes sont présents sur le chromosome 10 pour *ADD3* et le chromosome 3 pour *KAT2B*.En parallèle, à l'aide de GeneMatcher (https://genematcher.org/), nous avons identifié deux autres familles portant des mutations bialléliques dans le gène *ADD3* (respectivement la famille B et C, **Figure 20**) et présentant une atteinte neurologique (avec ou sans cataracte), mais sans signe cardiaque ni de SNCR. De manière intéressante, des mutations autosomiques récessives dans le gène *ADD3* ont déjà été décrites chez des patients présentant une atteinte neurologique isolée comme c'est le cas pour les patients de la famille B et C (Kruer et al., 2013).



Figure n°20 : Arbres généalogiques et ségrégation des mutations identifiées dans les gènes ADD3 et KAT2B dans les familles A, B et C.

Sous chaque mutation est indiquée la conservation phylogénétique de l'acide aminé modifié.

Les adducines assurent la liaison entre le cytosquelette d'actine et le squelette sous membranaire de spectrine, ainsi que le capping de l'extrémité positive des filaments d'actine permettant ainsi de maintenir la structure du cytosquelette d'actine (Matsuoka et al., 2000). Il existe trois isoformes alpha, beta et gamma (ADD α , ADD β , ADD γ , respectivement codées par les gènes *ADD1*, *ADD2* et *ADD3*). L'adducine- γ existe sous forme d'hétérodimères ou hétérotétramères avec les adducines α et β (ADD $\alpha\beta$ ou ADD $\alpha\gamma$). Elle possède trois domaines, la tête et le cou qui servent à l'oligomérisation et la queue qui permet l'interaction avec d'autres acteurs, notamment l'actine et la spectrine, par l'intermédiaire d'un domaine apparenté au MARCKS (Myristoylated Alanine-rich C Kinase Substrate) très conservé entre les trois isoformes (**Figure 21-A**). La forme ADD $\alpha\gamma$ est exprimée de façon ubiquitaire alors que la forme ADD $\alpha\beta$ est majoritairement exprimée dans les érythrocytes et le cerveau (Sahr et al., 2009). La mutation faux-sens *ADD3* c.1975G>C identifiée chez les patients de la

famille A entraîne le changement de l'acide glutamique (E) en glutamine (Q) à la position 659 de la protéine ADDy (notée p.E659Q) dans la région C-terminale au niveau du domaine de la queue de la protéine. Pour la famille B, la mutation *ADD3* c.86A>G code pour la variation protéique ADDy p.N29S dans la région de la tête de la protéine. Cet acide aminé étant très peu conservé parmi les autres espèces, il a probablement un rôle mineur dans la fonction de la protéine. Les deux dernières mutations identifiées dans la queue de *ADD3* sont *ADD3* c.1588 G>A et *ADD3* c.995A>G et conduisent respectivement aux variations protéiques ADDy p.V530I et p.N332S (**Figure 21-A**). *KAT2B* code la protéine KAT2B, également appelée PCAF (« P300/CBP-Associated Factor »), une lysine acétyltransférase impliquée dans l'acétylation des histones induit un décompactage de la chromatine rendant disponible à la transcription les zones acétylées (Puri et al., 1997). La mutation *KAT2B* c.920T>C identifiée chez les patients conduit à la variation protéique KAT2B p.F307S dans le domaine PCAF (**Figure 21-B**).

Basée sur ces données génétiques, notre hypothèse était la suivante : dans la famille A les mutations d'*ADD3* seraient à l'origine du phénotype neurologique et de la cataracte, mais pas de la cardiomyopathie ni de la maladie rénale, que nous supposons être dues à la mutation de *KAT2B*.



Figure n°21 : Schéma de l'ADNc et de la protéine avec la localisation et la conservation des mutations dans les familles A, B et C pour les gènes ADD3 et KAT2B.

(A) Pour le gène ADD3. L'abréviation MARCKs est Myristoylated Alanine-rich C Kinase Substrate. (B) Pour le gène KAT2B. L'abréviation PCAF est P300/CBP-associated factor. En dessous de chaque mutation est indiquée la conservation phylogénétique de l'acide aminé modifié.

B. Objectifs

Bien souvent, la complexité des phénotypes dans les maladies polygéniques ne permet pas d'établir une corrélation génotype-phénotype. Les maladies impliquant deux gènes sont donc les plus simples, en théorie, à analyser. Avec cette étude, utilisant le modèle de la drosophile, nous proposons une approche générale pour évaluer la pathogénicité de chacune des mutations et ainsi décomposer les contributions de chaque mutation ou variant de gènes aux phénotypes cliniques en question. Pour cela, nous avons réalisé des tests fonctionnels in vitro dans une lignée immortalisée de podocytes humains, et in vivo dans le modèle de la drosophile. Ce travail a été effectué en collaboration avec le groupe de Matias Simons qui dirige l'équipe « Biologie et maladies épithéliales » à l'Institut Imagine et qui utilise la drosophile comme modèle d'étude principal. L'ensemble des résultats obtenus sur ce projet ont fait l'objet d'un article publié dans le journal PLOS Genetics en 2018 dans lequel je suis copremier auteur (cf. Annexe 1). Je vous présenterai ci-après uniquement les résultats issus de mon travail effectué au cours de mes années à l'EPHE (depuis septembre 2017). Mes objectifs principaux étaient d'une part d'étudier la contribution de chacune des variations ADDγ p.E659Q et KAT2B p.F307S aux phénotypes observés chez la drosophile afin de permettre d'établir une corrélation génotypephénotype chez les patients et d'autre part d'étudier la possibilité d'un effet synergique de ces deux mutations.

C. <u>Matériels et méthodes</u>

1. <u>Modèle de la drosophile</u>

Afin de réaliser les expériences, nous avons dû croiser différentes lignées de drosophiles. Nous avons utilisé deux approches pour répondre à notre problématique.

Dans un premier temps, nous avons créé des lignées pour *Hts^{null}* et *Gcn5^{null}* (respectivement homologues de *ADD3* et *KAT2B*) afin d'étudier les mutations séparément. Pour cela, nous avons utilisé les déficiences qui sont des outils génétiques permettant de déléter la région génomique porteuse du gène d'intérêt sur un allèle (respectivement Df(2R) pour *hts* et Df(3L) pour *Gcn5*). Afin d'exprimer ADDαγ WT sur un fonds génétique *hts^{null}*, nous avons créé la condition *hts^{null}*/Df(2R) ; ADDαγ WT qui correspond au croisement entre les drosophiles *hts^{null}* à l'état hétérozygote et qui expriment les transgènes ADDα et ADDγ WT (sous contrôle du promoteur de la tubuline permettant l'expression ubiquitaire des transgènes (tub>) grâce au système UAS-Gal4) avec les drosophiles Df(2R) (**Figure 22-A**). Ce système permet la synthèse de la protéine Gal4 grâce à un promoteur ubiquitaire ou spécifique d'un tissu. Par exemple, les promoteurs de la tubuline ou du gène *Dautherless* peuvent être utilisés pour une expression ubiquitaire du transgène (noté tub> ou da>) (**Figure 23-A**). La construction ADDαγ

p.E659Q a été créée de la même manière que celle décrite précédemment pour ADDay WT. Nous avons réalisé la même méthode pour réaliser les lignées *Gcn5*. La lignée *Gcn5*^{E333st} (don de C. Carré) a été généré par l'insertion d'un codon stop, conduisant à la synthèse d'une protéine tronquée à partir de la position 333. La condition *Gcn5*^{E333st}/Df(3L) ; Gcn5 WT correspond à la génération F1 des drosophiles obtenues à partir d'un croisement entre les drosophiles KO pour *Gcn5* à l'état hétérozygote (appelé *Gcn5*^{E333st}), qui expriment le transgène *Gcn5* WT et les drosophiles Df(3L). Il en va de même pour la construction Gcn5 p.F304S (**Figure 22-B**). Les constructions sont exprimées de manière ubiquitaire grâce au promoteur du gène *Dautherless* (da>) et de manière spécifique directement dans les néphrocytes grâce au promoteur du gène *Dorothy* (dot>). La lignée yw correspond à une lignée WT.



Figure n°22 : Croisement des Drosophiles pour obtenir les lignées Hts^{null}/Df(2R);UAS-ADD3WT et UAS-Gcn5WT ;Gcn5^{E333st}/Df(3R)

La couleur rouge permet d'indiquer les drosophiles choisis pour les expériences. Les mêmes croisements ont été réalisés pour les conditions *Hts^{null}/*Df(2R);UAS-ADD3 E659Q et UAS-Gcn5 F307S ;Gcn5^{E333st}/Df(3R). Cyo est un balancer permettant de discriminer les drosophiles par leur ailes recourbées. Les balancers empêchent la recombinaison entre les chromosomes homologues, ils sont donc létal embryonnaire à l'état homozygote (drosophiles grises). Les drosophiles portant le balancer Tm6b ont plus de poils sur les épaules ce qui permet de les reconnaitre. (A) Exemple des combinaisons génétiques possibles lors d'un croisement entre ;Hts^{null}/Cyo;UAS-ADD3WT et ;Df(2R)/Cyo ainsi que (B) entre Gcn5WT/Cyo ;Gcn5^{E333st}/Tm6b et ;WT/WT; Df(3L)

Dans un deuxième temps, nous avons étudié la possibilité d'un effet synergique entre les deux gènes, en exprimant la protéine humaine ADD γ WT ou mutée (toujours associée à l'expression de la protéine ADD α) sur un fonds génétique où l'expression des deux gènes endogènes *hts* et *Gcn5* a été réduite (appelé double KD *hts*^{RNAi}/ *Gcn5*^{RNAi}) en utilisant deux ARN interférents (appelé RNAi) qui vont s'exprimer uniquement dans les néphrocytes de la drosophile (utilisation de Dot>). La lignée exprimant ADD $\alpha\gamma$ WT sur un fonds double KD *hts*^{RNAi}/ *Gcn5*^{RNAi} correspond à la génération F1 des drosophiles obtenues d'un croisement entre les drosophiles KD pour le gène *hts*^{RNAi}/ *Gcn5*^{RNAi} et les drosophiles portant les transgènes ADD $\alpha\gamma$ WT. Il en va de même pour la construction ADD $\alpha\gamma$ p.E659Q. L'expression du RNAi se fait de la même manière que décrite précédemment, en utilisant le système UAS-Gal4, la séquence du RNAi étant placée en aval de la séquence activatrice UAS (**Figure 23-B**).





2. <u>Immunofluorescence</u>

Cette technique permet de détecter par immunofluorescence une protéine spécifiquement grâce à des anticorps dirigés contre cette dernière et des anticorps couplés à un fluorochrome. Cela nous permet de vérifier l'expression et la localisation de cette protéine. Les drosophiles ont été disséquées un jour après éclosion puis fixées à 100°C dans une solution de NaCl 0,7 % avec 0,05 % Triton X-100 pendant 5 secondes. Elles ont ensuite été incubées à 4°C pendant 12 h avec des anticorps primaires reconnaissant les protéines KIRRE et PYD (dilution1/200 en PBS 1X/0.05 % Triton X-100). Après 3 rinçages pendant 5 min en PBS 1X/0,05 % Triton X-100, l'anticorps secondaire est incubé (dilution 1/200 en PBS 1X/0,05 % Triton X-100) pendant 2h à température ambiante. Après 3 rinçages pendant 5 min en PBS 1X/0,05 % Triton X-100, les drosophiles disséquées sont rincées en PBS 1X puis

mises sur une lame grâce au milieu de montage Fluoprep. Après une nuit à 4°C, les images sont prises au microscope confocal (Leica TSC SP8) à la plateforme de microscopie d'Imagine.

3. Test de géotaxie

Ce test permet de mettre en évidence un défaut d'orientation spatiale et des difficultés de coordination chez les drosophiles. Pour réaliser ce test, les drosophiles sont transférées dans un tube gradué et après tapotement pour les faire tomber au fond du tube, le nombre de centimètres grimpés en 8 secondes par les drosophiles est mesuré (Gargano et al., 2005).

4. <u>Statistiques</u>

Les quantifications ont été réalisées sur trois expériences indépendantes avec le test statistique one-way ANOVA grâce au logiciel GraphPad Prism version 5. Pour toutes les figures : ns, non significatif, * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001.

D. <u>Résultats</u>

La drosophile étant un organisme moins complexe que les mammifères, il existe des gènes paralogues présents chez l'homme qui n'ont qu'un seul orthologue chez la drosophile. Pour adducine, il n'existe que le gène *hu li tai shao ou hts*, orthologue des trois gènes *ADD1*, *ADD2* et *ADD3* chez l'homme. La région protéique d'ADDγ où se trouve l'acide aminé muté E659 n'étant pas conservée chez la drosophile, le gène humain *ADD3* a été utilisé dans les expériences de « sauvetage » chez la drosophile. Pour *KAT2B*, il existe le gène *Gcn5* qui est en fait l'orthologue chez la drosophile du gène *KAT2A*, un paralogue du gène humain *KAT2B*. La région où est localisée la mutation de *KAT2B* étant bien conservée entre la drosophile et l'homme, il a été possible de réaliser les expériences de sauvetage avec le gène *Gcn5*, la variation protéique p.F307S de *KAT2B* se trouvant en position 304 de la protéine Gcn5.

1. <u>Effet de chaque mutation sur le phénotype des drosophiles *hts^{null}* ou *Gcn5^{null}*</u>

Pour valider la pathogénicité des mutations, nous avons dans un premier temps étudié leur impact sur le phénotype global de drosophiles hémizygotes *hts^{null}* ou *Gcn5^{null}* c'est-à-dire qui n'expriment qu'une copie du gène *hts* ou *Gcn5*. En effet, les drosophiles déficientes pour *Hts* (appelé *Hts^{null}*) meurent à la fin du stade larvaire avec seulement 6 % des individus qui atteignent le stade adulte (Ohler et al., 2011). Les drosophiles *Hts^{null}* survivantes ont des mouvements désordonnés, une désorganisation des facettes composant l'œil et une incapacité à voler. Quant aux drosophiles déficientes pour *Gcn5* (*Gcn5*^{E333st} nommée ci-après *Gcn5^{null}*), elles meurent entre la fin du stade larvaire et le début du stade pupe, et aucun survivant n'est observé (Carré et al., 2005). Ainsi, pour étudier

l'effet d'une mutation, nous avons exprimé cette mutation dans ces mouches déficientes et observé le phénotype qui en résulte.

a) Étude de la mutation ADDy p.E659Q sur fonds hts^{null}

Du fait de l'hétérodimérisation des protéines ADD α et ADD γ , il a été décidé d'introduire aussi le gène ADD1 de façon à obtenir des dimères ADDαy. En effet, nous avons montré que l'expression d'ADDα ou de la forme sauvage de l'ADDy (ADDy WT) seule ne permet pas de restaurer une viabilité normale des mouches déficientes, contrairement à l'expression simultanée de l'ADDα et de l'ADDγ WT (ADDαy WT) qui permet une augmentation de 60 % de la viabilité des mouches adultes (Figure 24-A). Ce résultat illustre l'importance de la dimérisation des ADD α et ADDy. De la même façon, afin d'étudier l'effet de la variation protéique ADDy p.E659Q, nous avons exprimé l'ADDay p.E659Q dans les drosophiles hts^{null}. Les mouches exprimant l'ADDay p.E659Q ont une viabilité significativement diminuée comparée aux mouches exprimant l'ADDay WT (Figure 24-A). L'étude des mouches « survivantes » ADDay WT et ADDay p.E659Q montre qu'elles ne présentent aucun défaut au niveau des yeux et de la morphologie des ailes comme décrit pour les mouches survivantes hts^{null} (Figure 24-B). Cependant, grâce à un test de géotaxie, nous avons pu montrer que les mouches survivantes hts^{null} exprimant la protéine mutée ADDay p.E659Q présentent un défaut d'orientation spatiale et des difficultés de coordination, ce qui se traduit par une réduction d'un tiers du nombre de centimètres escaladés par rapport aux mouches exprimant l'ADDαγ WT, témoin d'un défaut neurologique chez la drosophile (Figure 24-C). Ces résultats suggèrent qu'ADDy p.E659Q est une mutation qui conduit à une protéine moins efficace que la protéine sauvage (appelé mutation hypomorphe) chez la drosophile.



Figure n°24 : Étude des différents transgènes ADD1 et/ou ADD3 sur fonds Hts^{null}.

(A) Expérience de viabilité par quantification du nombre de drosophiles atteignant l'âge adulte en fonction de leur génotype un jour après éclosion. (B) Analyse phénotypique des drosophiles yw/Df(2R), *hts* ^{null/}Df(2R) et exprimant ADDαγ WT ou ADDαγ p.E659Q sur le fonds génétique *hts*^{null}. Échelle : 1 mm pour le corps, 500 µm pour les ailes et 200 µm pour l'œil. (C) Expérience de géotaxie sur les drosophiles parvenant à l'âge adulte.

b) Étude de la mutation KAT2B p.F307S sur fonds Gcn5^{null}

Nous avons dans un premier temps montré que les drosophiles déficientes Gcn5^{null} exprimant les protéines humaines KAT2A ou KAT2B seules, ou la combinaison des deux ne sont pas viables à l'âge adulte et meurent à la fin du stade larvaire suggérant que les orthologues humains ont des fonctions et une structure différente du gène Gcn5 de drosophile (Figure 25-A). Nous avons donc utilisé la protéine Gcn5 de la drosophile. Afin d'étudier l'effet de la variation protéique KAT2B p.F307S, nous avons exprimé chez les mouches Gcn5^{null}, les protéines Gcn5 WT ou Gcn5 p.F304S. Nous avons également utilisé la variation Gcn5 p.S478F comme contrôle négatif car elle correspond à la variation p.S502F retrouvée à l'état homozygote chez un individu sain dans une banque de données constituée dans l'équipe et elle est prédite comme potentiellement délétère par les logiciels de prédiction. Nous avons ainsi montré que lorsque Gcn5 WT ou Gcn5 p.S478F sont exprimées sur le fonds Gcn5^{null}, il y a une augmentation de plus de 95 % de la viabilité des mouches à l'âge adulte alors que lorsque Gcn5 p.F304S est exprimée, cette viabilité est très fortement diminuée (Figure 25-A). D'autre part, alors que les mouches exprimant Gcn5 p.S478F sont normales à l'âge adulte, les drosophiles exprimant Gcn5 p.F304S qui parviennent à survivre ont une désorganisation des facettes qui composent l'œil, des ailes boursouflées, une incapacité à voler et environ 40 % des animaux ont des défauts de morphologie des pattes (Figure 25-B). Ces résultats suggèrent que KAT2B p.F307S est une mutation perte de fonction chez la drosophile.



Figure n°25 : Étude des différents transgènes Gcn5 sur fonds Gcn5^{null}.

(A) Quantification du nombre de drosophiles atteignant l'âge adulte en fonction de leur génotype un jour après éclosion. (B) Analyse phénotypique des drosophiles exprimant Gcn5 WT, Gcn5 p.F304S ou Gcn5 p.S478F sur le fonds *Gcn5^{null}*. Échelle : 500 μ m pour les ailes et les pattes ainsi que 200 μ m pour l'œil.

2. <u>Effet de chaque mutation sur le phénotype rénal des drosophiles</u> <u>*hts^{null}* ou *Gcn5^{null}*</u>

Le système rénal chez la drosophile est composé des néphrocytes de Garland (NGs) et péricardiques (NPs) qui réalisent la filtration de l'hémolymphe. C'est à la surface de ces néphrocytes que se trouvent les diaphragmes de fente (cf Introduction). Dans les NGs, la protéine Hts est localisée sous le diaphragme de fente alors que Gcn5 est exprimée dans le noyau. Pour démontrer le rôle majeur d'une protéine dans l'intégrité du diaphragme de fente (DF), il est possible de faire des immunomarquages avec des anticorps spécifiques de protéines membranaires des néphrocytes telles que KIRRE et PYD, orthologues des protéines NEPH1 et ZO-1, respectivement, qui sont exprimées au niveau du DF chez les mammifères. Ce type de marquage permet ainsi d'observer la morphologie et le nombre des néphrocytes, mais également d'observer la perte des marquages en cas de défaut de l'intégrité des néphrocytes.

a) *Impact* de la mutation ADDy p.E659Q sur les néphrocytes péricardiques

Nous avons donc disséqué les néphrocytes péricardiques (NPs) à 15 jours sur les mouches survivantes *hts^{null}* exprimant ADDαγ WT ou ADDαγ p.E659Q puis réalisé des marquages avec les anticorps contre KIRRE et PYD (**Figure 26-A**). La quantification du nombre de néphrocytes qui exprime KIRRE et PYD n'a pas permis de mettre en évidence de différence entre les mouches exprimant ADDαγ WT ou ADDαγ p.E659Q suggérant que la variation protéique ADDγ p.E659Q n'entraîne pas de phénotype rénal chez la drosophile (**Figure 26-B**).



Figure n°26 : Néphrocytes péricardiques à 15 jours issus des mouches déficientes Hts^{null} exprimant ADDαγ WT ou ADDαγ p.E659Q.

(A) Néphrocytes péricardiques marqués avec les anticorps KIRRE (rouge) et PYD (bleu). Échelle : 30µm. (B) Quantification du nombre de néphrocytes en fonction de la condition.

b) Impact de la mutation Gcn5 p.F304S sur les néphrocytes péricardiques

Le même type d'expérience a été réalisé sur les mouches déficientes *Gcn5^{null}* exprimant Gcn5 WT ou Gcn5 p.F304S et qui atteignent l'âge adulte. La majorité des mouches exprimant la mutation Gcn5 p.F304S présentent une distribution et une forme anormales des néphrocytes péricardiques avec un positionnement courbé autour du cœur alors que les néphrocytes péricardiques des mouches exprimant Gcn5 WT sont alignés de façon rectiligne le long du cœur comme dans le contrôle (**Figure 27-A**). Une diminution significative du nombre de néphrocytes exprimant KIRRE et PYD est également observée (**Figure 27-B**). Ces résultats suggèrent que la variation protéique KAT2B p.F307S est responsable d'un phénotype rénal chez la drosophile.



Figure n°27 : *Néphrocytes péricardiques issus de mouches exprimant Gcn5 WT et Gcn5 p.F304S sur fonds* Gcn5^{null}. (A) Néphrocytes péricardiques disséqués à partir des mouches déficientes *Gcn5^{null}* ayant atteint l'âge adulte (7-15 jours) après éclosion et exprimant Gcn5 WT ou Gcn5 p.F304S marqués avec les anticorps KIRRE (rouge) et PYD (bleu). Échelle : 30µm. (B) Quantification du nombre de néphrocytes péricardiques avec un phénotype normal. Les néphrocytes avec une mauvaise position, une forme anormale, plusieurs noyaux, des noyaux fragmentés ou un nombre réduit de néphrocytes (<20) ont été évalués. Si aucune de ces caractéristiques est retrouvées le score obtenu est « normal », une caractéristique : « intermédiaire », deux caractéristiques : « moyennement sévère » et plus de deux : « sévère ».

3. <u>Étude des effets synergiques d'ADDγ et KAT2B spécifiquement</u> <u>dans les néphrocytes</u>

a) Effets synergiques de hts et Gcn5 après extinction de leur expression

En prenant en compte les résultats précédents, nous avons émis l'hypothèse que les deux mutations ADDγ p.E659Q et KAT2B p.F307S sont nécessaires à l'apparition des défauts rénaux précoces. Pour tester cette hypothèse, l'expression des gènes *hts* et *Gcn5* a été diminuée par ARN interférence en utilisant des RNAi exprimés de façon spécifique dans les néphrocytes chez la drosophile. Dans un premier temps, nous avons évalué la contribution de chaque gène en diminuant l'expression de *hts* (appelé *hts*^{RNAi}) ou de *Gcn5* (appelé *Gcn5*^{RNAi}) par un siARN. Ensuite, nous avons évalué la synergie des deux gènes en réalisant un double KD de *hts* et *Gcn5* (appelé double KD *hts*^{RNAi}/

Gcn5^{*RNAi*}). L'objectif de cette expérience était de connaître l'effet de la diminution d'expression de ces deux gènes sur les néphrocytes de la drosophile adulte. Dans le cas d'une synergie entre *hts* et *Gcn5*, une aggravation du phénotype observé dans les simples KD (*hts*^{*RNAi*} ou *Gcn5*^{*RNAi*}) est attendu. Après quantification du nombre de néphrocytes péricardiques à 3 jours après éclosion, dans les conditions de *hts*^{*RNAi*} ou *Gcn5*^{*RNAi*}, il n'a pas été observé de diminution significative du nombre de néphrocytes péricardiques alors qu'une diminution d'un tiers des néphrocytes est observée dans le double KD *hts*^{*RNAi*} (**Figure 28-A-B**). Lorsque cette même expérience est réalisée à 15 jours après éclosion, une diminution du nombre de néphrocytes est également observée dans les conditions *hts*^{*RNAi*} et *Gcn5*^{*RNAi*} simple (**Figure 28-C**). Ce résultat soutient l'idée d'une synergie entre les deux gènes *ADD3* et *KAT2B* car un effet plus précoce est observé dans le double KD *hts*^{*RNAi*}/*Gcn5*^{*RNAi*}.



Figure n°28 : *Effet synergique entre les gènes hts et Gcn5 sur les néphrocytes péricardiques à 3 jours et à 15 jours.* (A) Néphrocytes péricardiques disséqués des mouches adultes *hts*^{RNAi}, *Gcn5*^{RNAi} et KD *hts*^{RNAi}/*Gcn5*^{RNAi} 3 jours après éclosion, marqués avec les anticorps dirigés contre KIRRE (rouge) et PYD (bleu). Échelle : 30 μm. (B) Quantification du nombre de néphrocytes exprimant KIRRE et PYD à 3 jours (C) à 15 jours.

b) Effets synergiques des mutations ADDy p.E659Q et KAT2B p.F307S après extinction de leur expression

Considérant que la mutation de *KAT2B* correspond à une perte de fonction presque complète, nous avons effectué un double KD *hts^{RNAi}*/*Gcn5^{RNAi}* et ré-exprimé uniquement les transgènes adducine- $\alpha\gamma$, évitant ainsi la complexité de combiner dans une mouche, les allèles *hts^{RNAI}* et *Gcn5^{RNAI}* ainsi que les différents transgènes ADD $\alpha\gamma$ et Gcn5 sous le contrôle d'un seul « driver » GAL4. Pour étudier le rôle spécifique de la mutation ADD γ p.E659Q, nous avons décidé de ré-exprimer la protéine ADD $\alpha\gamma$ WT ou ADD $\alpha\gamma$ p.E659Q sur un fonds double KD *hts^{RNAi}*/*Gcn5^{RNAi}* et de quantifier le nombre de néphrocytes qui expriment les marqueurs de différenciation KIRRE et PYD à 3 jours après éclosion. Ainsi, en comparant les néphrocytes des mouches exprimant ADD $\alpha\gamma$ WT dans ces conditions, une diminution d'au moins la moitié du nombre de néphrocytes exprimant KIRRE et PYD a été observée chez les mouches exprimant la protéine mutée ADD $\alpha\gamma$ p.E659Q ; de façon similaire à ce qui est observé chez les drosophiles avec le double KD *hts^{RNAi}/Gcn5^{RNAi}* (**Figure 29-A**). Les résultats de ces expériences nous permettent de conclure qu'avec le double KD *hts^{RNAi}/Gcn5^{RNAi}*, ADDαγ p.E659Q ne restaure pas le phénotype sauvage alors qu'il y a une restauration partielle avec la protéine WT (**Figure 29-B**). Le fait que sur le fonds *hts^{null}* seul ou sur le fonds *Gcn5^{null}* seul, il n'y avait pas de défaut rénal nous conforte dans l'idée d'une synergie entre *ADD3* et KAT2B (**Tableau 4**).



Figure n°29 : Néphrocytes péricardiques à 3 jours issus de mouches exprimant ADD $\alpha\gamma$ WT ou ADD $\alpha\gamma$ p.E659Q sur un fonds double KD Hts^{RNAi} et Gcn5^{RNAi}.

(A) Néphrocytes péricardiques disséqués des mouches adultes ADDαγ p.E659Q sur fonds double KD *hts^{RNAi}/Gcn5^{RNAi}* 3 jours après éclosion, marqués avec différents anticorps KIRRE (rouge) et PYD (bleu). Échelle : 30 µm. (B) Quantification du nombre de néphrocytes exprimant KIRRE et PYD.

	Cérébral	Rénal
Hts KO + ADDγ p.E659Q	Défauts neurologiques	Absence de défauts rénaux à 15 jours
Gcn5 KO + Gcn5 p.F307S	/	Défauts rénaux mineures à 15 jours
Hts KD + Gcn5 KD + ADDγ p.E659Q	/	Défauts rénaux rénaux majeurs dès 3 jours

Tableau n°4 : Phénotypes observé dans les différentes conditions testées.

E. <u>Discussion – conclusion</u>

Au cours de cette étude, nous avons validé la pathogénicité de deux variants identifiés dans deux gènes différents (*ADD3* E659Q et *KAT2B* F307S) chez les individus d'une même famille présentant un SNCR, une cardiomyopathie et des défauts neurologiques. Le modèle de la drosophile nous a permis de valider l'effet de chaque mutation, mais aussi l'effet des deux mutations combinées grâce à l'expression de chacun des gènes d'intérêt avec le système UAS-Gal4.

Nous avons dans un premier temps exprimé les gènes séparément pour étudier l'impact de chacune des mutations. Nous avons ainsi montré que l'expression de la mutation ADDy p.E659Q à elle seule n'est pas suffisante pour générer un phénotype rénal chez la drosophile. Cependant, les mouches développent des défauts d'orientation spatiale et des difficultés de coordination, reflet de défauts neurologiques chez la drosophile. Ces défauts sont en accord avec ceux observés chez les patients qui

sont mutés seulement dans le gène ADD3, c'est-à-dire des défauts neurologiques et une absence de symptômes rénaux (Kruer et al., 2013). En revanche pour KAT2B, aucun patient porteur d'une mutation et de défauts neurologiques n'a été identifié jusqu'à présent. Pour KAT2B, nous avons montré que les mouches exprimant la mutation Gcn5 p.F304S sur fonds Gcn5^{null} ne présentent pas de défauts des néphrocytes de Garland au stade larvaire, mais elles ont des défauts au niveau des néphrocytes péricardiques à l'âge adulte (réduction du nombre, morphologie et localisation anormales) confirmant le fait que la mutation Gcn5 p.F304S altère la fonction de Gcn5 dans les néphrocytes. De façon intéressante, nous avons montré chez les mouches Gcn5^{null}, que bien que normaux au stade larvaire, les néphrocytes de Garland ont un niveau d'acétylation diminué qui peut revenir à la normale lorsque l'on exprime Gcn5 WT, mais pas Gcn5 p.F304S (voir Annexe 1). Cependant, ce défaut rénal mineur n'explique pas l'atteinte rénale précoce observée chez les patients de la famille consanguine étudiée (protéinurie à 13 ans). Il est également intéressant de noter qu'un enrichissement de variants rares de KAT2B a été mis en évidence dans une population de patients ayant une atteinte glomérulaire sporadique, suggérant que KAT2B pourrait être un facteur de susceptibilité dans des formes de protéinurie ayant différentes causes (Yu et al., 2016). Il existe également un modèle murin d'invalidation du gène KAT2B (par interférence à l'ARN) qui ne présente pas de protéinurie à 12 semaines et dont les pédicelles des podocytes sont majoritairement normaux (Yu et al., 2016). Cette absence de phénotype peut être due à la redondance avec le gène KAT2A qui n'est pas invalidé dans ce modèle, alors qu'il a été montré que la perte de KAT2B peut être compensée par KAT2A au cours du développement murin (Xu et al., 2000). Néanmoins, KAT2B est fortement exprimé chez la souris dans le cœur et le rein, en particulier dans les podocytes (Boerries et al., 2013; Yu et al., 2016). Ainsi, la mutation Gcn5 p.F307S entraine dans un fond Gcn5^{RNAi} une diminution du débit cardiague, une arythmie ainsi qu'un raccourcissement du diamètre diastolique, en accord avec les anomalies cardiaques observées chez les patients (voir article en Annexe 1).

Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés à la possibilité d'une synergie entre les deux gènes pour expliquer l'atteinte rénale précoce observée chez les patients de la famille A. Il a été montré plusieurs fois dans la littérature qu'une action combinée de deux gènes peut générer l'apparition de symptômes plus précoces ou l'apparition de défauts dans un nouvel organe (Lemmers et al., 2012; Mariot et al., 2015). Pour tester cette synergie dans le modèle drosophile, nous avons réexprimé les protéines ADDαγ WT et ADDαγ p.E659Q sur un fonds double KD *hts^{RNAi}/ Gcn5^{RNAi}* pour les gènes de la drosophile, *hts* et *Gcn5*. Les résultats de cette expérience nous montrent qu'une déplétion de *Gcn5* mais également de *hts* est nécessaire pour l'apparition d'un phénotype rénal précoce. Bien qu'*ADD3* et *KAT2B* soient présents sur deux chromosomes différents (respectivement les chromosomes 10 et 3), il est possible qu'ils soient sur des territoires chromosomiques proches. KAT2B étant une protéine ayant un rôle dans l'ouverture de la chromatine lors de la transcription grâce à l'acétylation des histones, nous pouvons imaginer que le gène *ADD3* soit une cible de cette acétyltransférase. Cela pourrait être testé par immunoprécipitation de la chromatine. De plus, il a déjà été montré que KAT2B acétyle une grande variété de protéines dont des régulateurs du cytosquelette connus pour être responsables de glomérulopathies héréditaires ou de cardiomyopathies quand ils sont mutés (Fournier et al., 2016), comme par exemple ACTN4 (Kaplan et al., 2000) et TTC21B (Huynh Cong et al., 2014).

Bien que le mécanisme d'action exact entre *ADD3* et *KAT2B* reste à élucider, l'ensemble de ces résultats est en faveur d'une action synergique entre les mutations de ces deux gènes quant à l'apparition du phénotype rénal précoce. Ainsi les mutations homozygotes dans *KAT2B* et dans *ADD3* pourraient conduire à l'apparition d'une atteinte rénale relativement précoce, en plus du phénotype neurologique qui est habituellement observé chez les patients portant des mutations dans le gène *ADD3*. De manière générale, ces résultats peuvent servir de modèle pour l'identification de nouvelles relations entre différents gènes, confirmant que la drosophile est un modèle pertinent pour l'étude des maladies génétiques humaines. Cela permettra une meilleure compréhension des causes génétiques chez les patients atteints de néphropathie.

2^{ÈME} PARTIE : RÔLE DU COMPLEXE KEOPS DANS LA PHYSIOPATHOLOGIE DU GAMOS

A. <u>Contexte</u>

Le laboratoire s'intéresse depuis plusieurs années au syndrome de Galloway-Mowat (GAMOS), une maladie héréditaire très rare de transmission autosomique récessive caractérisée par l'association d'un syndrome néphrotique cortico-résistant (SNCR), d'anomalies neurologiques et d'une microcéphalie. Après avoir identifié le premier gène, impliqué dans le GAMOS (Colin et al., 2014), le laboratoire en collaboration avec le groupe de F. Hildebrandt a identifié des mutations dans les gènes codant les 4 sous-unités du complexe KEOPS qui sont OSGEP, LAGE3, TP53RK et TPRKB (Braun et al., 2017). Ce complexe est impliqué dans la biosynthèse de la modification universelle t⁶A des ARN de transfert (ARNt). Or, les modifications post-transcriptionnelles des ARNt sont essentielles à leur fonction améliorant l'efficacité et la fidélité de la traduction. De plus, il a déjà été montré que de nombreuses maladies neurodéveloppementales sont dues à des défauts de modifications des ARNt (Ramos and Fu, 2019). Nos travaux collaboratifs avec l'équipe de F. Hildebrandt ont montré que lorsque l'expression des gènes OSGEP, TP53RK ou TPRKB est diminuée par interférence à l'ARN (« knockdown », KD) dans des lignées de podocytes humains, divers processus cellulaires sont perturbés, notamment la prolifération, l'apoptose et la synthèse du t⁶A (Braun et al., 2017). D'après nos connaissances actuelles, OSGEP est la sous-unité catalytique du complexe, cependant, la fonction précise des autres sous-unités du complexe KEOPS n'est pas encore connue. De façon intéressante, la protéine humaine C14ORF142 (dénommée à présent GON7), qui est une protéine de petite taille ayant une structure désordonnée, c'est-à-dire sans structure tridimensionnelle stable, a été récemment identifiée comme étant l'orthologue de Gon7, la 5^{ème} sous-unité du complexe KEOPS de levure (Wan et al., 2017). Des expériences in vitro chez la levure ont montré que l'ensemble du complexe KEOPS fonctionnerait sous forme d'un homodimère via Pcc1, l'orthologue de LAGE3, ce dernier jouant un rôle de plateforme de dimérisation (Costessi et al. 2012, Wan et al., 2016). Récemment, l'équipe de Wan et al., a montré que l'interaction de LAGE3 avec GON7 empêche la dimérisation du complexe KEOPS via LAGE3 (complexe présent sous forme d'un octamère) avec pour conséquence un complexe sous forme de pentamère qui fonctionne de façon moins efficace entrainant une diminution de la quantité de t⁶A synthétisée par le complexe KEOPS (Figure 30, Wan et al. 2017). Ces résultats suggèrent que l'interaction de GON7 modulerait la fonction du complexe KEOPS, la présence de GON7 augmentant l'activité de biosynthèse du t⁶A.



Figure n°30 : Schéma de la dimérisation du complexe KEOPS en fonction de la présence de GON7 (adapté de Wan et al. 2017)

En parallèle, dans mon laboratoire d'accueil, des études ont été menées pour mieux comprendre le rôle de GON7 au sein du complexe KEOPS et des mutations ont récemment été identifiées dans les gènes *GON7* et *YRDC*, ce dernier codant l'enzyme YRDC qui réalise la première étape dans la biosynthèse du t⁶A (voir III.C. 3. dans Introduction). L'ensemble des résultats obtenus ont fait l'objet d'un article publié dans *Nature Communications* en 2019 dans lequel je suis 4^{ème} co-auteur (voir **Annexe 2**). De plus, pour modéliser la physiopathologie du GAMOS, un premier modèle murin invalidé pour le gène *Gon7* (« knock-out », KO) avait été généré au laboratoire avant mon arrivée sur ce projet, *GON7* étant le seul gène où une mutation non-sens a été trouvée à l'état homozygote chez les patients. Cependant, cette lignée *Gon7* KO ne présente aucun phénotype au niveau du cerveau et du rein. Un second modèle de KO a été établi au laboratoire pour le gène *Osgep* (avec la délétion d'une paire de base) en utilisant la technique d'édition du génome CRISPR/Cas9 (Wu et al., 2013; Okamoto et al., 2019). Cependant, le KO total du gène *Osgep* est létal à un stade embryonnaire très précoce empêchant toute étude du phénotype des animaux homozygotes. Ces deux modèles n'ont donc pas permis d'étudier le développement de la pathologie du GAMOS.

B. Objectifs de recherche

Les objectifs principaux de ce projet consistent à mieux comprendre la fonction du complexe KEOPS en utilisant une approche *in vitro* dans des modèles cellulaires, et d'étudier la physiopathologie du GAMOS *in vivo* en utilisant des modèles murins. Les expériences *in vitro* avaient pour but d'étudier en particulier le rôle des protéines GON7 et LAGE3. Les expériences *in vivo* avaient pour objectif d'établir des modèles murins de « knock-in » (KI) par la technique CRISPR/Cas9 pour étudier l'impact de deux mutations sur les fonctions rénales et cérébrales : la première mutation se situe dans le gène *OSGEP* (p.R325Q) et la seconde dans le gène *LAGE3* (p.F137S), ces deux mutations ayant été identifiées chez des patients avec GAMOS.

C. <u>Matériels et Méthodes</u>

1. Culture cellulaire et transfection dans les HEK293T

La lignée de cellules HEK293T (cellules humaines dérivées de rein embryonnaire immortalisées) sont cultivées à 37°C dans du milieu complet DMEM: Dulbecco's modified eagles's medium 1X (Invitrogen, 41966-029), supplémenté par 10 % de SVF, 100 unités/ml de pénicilline/streptomycine, et 2 nM de L-glutamine (appelé DMEM complet). 1 million de cellules sont ensemencées dans une boite de culture de 10 cm (B10). Après adhésion des cellules sur la boîte, les cellules sont transfectées avec 5 µg de plasmides grâce à la Lipofectamine 2000 (ThermoFisher, 11668-019) (ratio de 1/3 soit 1 µg ADN pour 3 µl de lipofectamine). Dans un tube de 1,5 ml, 625 µl de milieu

Optimem (1X) (ThermoFisher, 31985-047) sont mélangés avec 15 μ l de lipofectamine. Dans un second tube, 625 μ l de milieu Optimem (1X) sont mélangés avec 5 μ g de plasmide. Après 5 minutes d'incubation, les deux tubes sont mélangés. Le mélange réactionnel est incubé 15 min à température ambiante puis distribué goutte à goutte sur les cellules. Pour la co-transfection de GON7-LAGE3, les quantités de plasmides et le volume de lipofectamine sont doublés. Le milieu de culture est changé après 5h de transfection avec du DMEM 1X complet.

2. Western Blot

La technique du western blot (WB) est une méthode qui permet la détection et l'identification de protéines d'intérêt dans un échantillon biologique à l'aide d'anticorps dirigés contre ces protéines. Les extraits protéiques sont obtenus après lyse cellulaire avec le tampon de lyse [NaCl 150 mM, Tris-HCl 50 mM pH 7, Triton 0,5 % avec des inhibiteurs de protéases et phosphatase (Complete et Phostop, Roche)]. Les protéines contenues dans le lysat sont dosées par dosage BCA (Thermo Scientific Pierce, 23225). Les protéines (50 μg) sont mélangées au bleu de charge Laemmli 2X (sigma, S3401-1VL) puis dénaturées à 95°C pendant 10 min. Les échantillons sont ensuite déposés sur le gel SDS-PAGE et mis à migrés pendant 1 h 30 à 100 V. Un marqueur de taille (Biorad, 161-0394) est utilisé pour avoir le profil de migration. Les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose avec le Trans-Blot Turbo (Biorad, 1704150) durant 10 min. La membrane est ensuite bloquée avec la solution Licor TBS (LI-COR, 927-70010) pendant 1 h et hybridée avec l'anticorps primaire correspondant au tag de chaque protéine à 4°C pendant 12 h (anti-HA et anti-V5, respectivement 12CA5 et V8137-2MG, dilution au 1/1000). Après trois lavages en PBS-tween (PBST) de 5 min, la membrane est incubée avec l'anticorps secondaire (LI-COR, 926-68072, dilution 1/15 000) pendant 30 min à l'obscurité. La membrane est lavée trois fois en PBS-tween (PBST) pendant 5 min. La révélation se fait sur la machine Licor (Odyssey Clx).

3. Conception et validation des guides CRISPR

La technique du CRISPR (Clustered Regular Interspaced Short Palindromic Repeats) permet de couper de manière ciblée l'ADN génomique (**Figure 31**). La protéine Cas9 (CRISPR-associated protein 9) est une endonucléase d'ADN guidée par un ARN, qui coupe les deux brins de la double hélice d'ADN. Cette technique utilise également un ARN guide (ARNg) c'est-à-dire un ARN simple brin composé d'une séquence complémentaire de la séquence d'intérêt fusionnée à une séquence en épingle à cheveux qui permet la liaison à la Cas9. L'ARNg dirige la Cas9 à l'endroit où l'ADN génomique (ADNg) doit être coupé (proche de la position de la mutation, respectivement p.R325Q et p.F137S pour les gènes *Osgep* et *Lage3*). Une fois la séquence de l'ADNg reconnue, la Cas9 reconnait le motif protospacer-adjacent

(appelé séquence PAM pour « Protospacer Adjacent Motif ») et coupe l'ADNg trois bases en aval. En plus de l'ARN simple brin et de la Cas9, un ADN simple brin (ssODN pour « single stranded donor oligonucleotides ») est également ajouté. Ce ssODN possède de part et d'autre de la mutation des séquences homologues aux séquences présentes sur les deux brins d'ADN génomique (ADNg) de la souris. Une fois l'ADNg coupé par la Cas9, le ssODN sera inséré par recombinaison homologue permettant la génération du modèle KI (**Figure 31**).



Figure n°31 : Principe de la technologie CRISPR/Cas9 (d'après https://www.gnis-pedagogie.org)

Les guides CRISPR ont été créés grâce au logiciel en ligne CRISPOR – tefor (crispor.tefro.net). Les guides ont été choisis en fonction de leur proximité avec la mutation d'intérêt (entre 10 et 15 pb). La séquence du ssODN a été mutée pour insérer un site de restriction enzymatique grâce à la dégénérescence du code génétique (respectivement KpnI pour la lignée murine Osgep p.R325Q, **Figure 32** et PvuII pour Lage3 p.F137S, **Figure 33**). Les ssODN ont été commandés sur le site Integrated DNA Technologies (https://eu.idtdna.com/pages).



Figure n°32 : Séquence des guides choisis et du ssODN pour le gène Osgep

Les introns sont représentés en minuscules, les exons en majuscules. Le PAM des guides est représenté en violet avec la séquence du guide en noir. La mutation du patient sur le ssODN est représentée en rouge avec le site de restriction enzymatique souligné. La séquence en bleue correspond à la partie en épingle à cheveux du guide pour la liaison à la Cas9.



Figure n°33 : Séquences des guides choisis et du ssODN pour le gène Lage3

Les séquences exoniques sont représentées en majuscules. Le PAM des guides est représenté en violet avec la séquence du guide en noir. La mutation du patient sur le ssODN est représentée en rouge avec les sites de restriction enzymatique soulignés. La séquence en bleu correspond à la partie en épingle à cheveux du guide pour la liaison à la Cas9.

L'injection de chaque guide avec la Cas9 et le ssODN dans des blastocystes murins (embryons à 6 jours de développement) a été réalisée afin de valider l'efficacité des guides. L'extraction de l'ADNg à partir des blastocystes injectés est réalisée avec 3 µL de tampon du kit QuickExtract (Lucigen, QE09050), puis incubée pendant 10 min à 65°C et 2 min à 95°C. Le génotypage puis le séquençage sont réalisés afin de connaître avec exactitude si le ssODN a été inséré.

4. Injection des constructions CRISPR dans le zygote murin

L'injection du mix CRISPR (ARNg, Cas9 et ssODN) dans le zygote murin a été réalisée en collaboration avec Pierre David, le responsable de la plateforme de transgénèse à l'Institut Imagine. Afin de créer les lignées murines portant la mutation choisie par la technique CRISPR/Cas9, 20 femelles âgées de 4 semaines sont superovulées par injection intrapéritonéale, puis chaque femelle est mise en accouplement avec un mâle. Le lendemain, les femelles présentant un bouchon vaginal sont sacrifiées et les oviductes sont prélevés puis déposés dans un milieu riche additionné de hyalurodinase. La hyalurodunase est une enzyme qui va permettre de disperser les cellules du cumulus (cellules qui maintiennent les zygotes ensemble) afin de les individualiser. L'ampoule (sac contenant les zygotes) est fendue puis les zygotes sont récupérés à l'aide d'une pipette et transférés dans un incubateur à 37° C avec 6 % de CO2. Le mix d'injection contenant 1,5 μ M de protéine Cas9 et 2 μ M d'ARN guide est laissé 10 min à température ambiante pour permettre la formation du complexe ribonucléoprotéique (ou RNP). Le mix d'injection est ensuite plongé dans la glace. La micro-injection du mélange RNP est effectuée dans le noyau du zygote. Les zygotes sont incubés à 37° C avec 6 % de CO2 toute la nuit. 12h après l'injection, tous les embryons doivent s'être développés au stade deux cellules avant de les réimplanter dans des femelles pseudo-gestantes.

5. <u>Génotypage</u>

L'extraction de l'ADNg est réalisée à partir de biopsie de queue de souris avec le kit Bioline (MyTaq Extract-PCR Kit, BIO-21127). L'ADN est extrait à partir d'une solution contenant 20 µl de tampon A, 10 µl de tampon B, 70 µl d'eau et incubé dans un thermocycleur à 75°C pendant 10 min puis à 95°C pendant 10 min. Ensuite une PCR et une digestion sont nécessaires afin d'identifier les différents génotypes des souris. La PCR nous permet d'amplifier une région particulière de l'ADN génomique (ADNg) murin grâce à des amorces situées de part et d'autre de l'exon contenant la mutation insérée (respectivement pour la lignée Osgep p.R325Q. **Figure 34** et la lignée Lage3 p.F137S, **Figure 35**).



Figure n°34 : Schéma des différentes tailles attendues des produits de PCR et digestion par Kpnl.

La taille attendue des produits de PCR pour une biopsie de souris de génotype WT est 432 pb alors que pour les souris portant la mutation p.F137S les tailles attendues sont 303pb et 129pb après digestion par l'enzyme de restriction KpnI.



Figure n°35 : Schéma des différentes tailles attendues des produits de PCR et digestion par Pvull. La taille attendue des produits de PCR pour une biopsie de souris de génotype WT est 398 pb alors que pour les souris portant la mutation p.F137S les tailles attendues sont 326 pb et 72pb après digestion par l'enzyme de restriction Pvull.

L'amplification des fragments d'ADN par PCR (Polymerase Chain Reaction) est réalisée à l'aide d'amorces spécifiques de chacun des exons. Cette technique repose sur l'incorporation des dNTPs par la polymérase une fois que l'amorce est hybridée au brin matrice. Le mix de PCR contient le mix bioline (1X), une amorce sens (0,5µM) ainsi qu'une antisens (0,5µM) dans un volume de 18 µL. Une quantité entre 50 – 100 ng d'ADNg est ajoutée dans le mix de PCR. Le volume final de cette réaction est de 20 μL. Un échantillon contrôle contenant de l'ADNg dont le génotype est déjà connu est également réalisé. Avant le premier cycle, il y a une étape de dénaturation préliminaire qui permet de bien séparer des brins d'ADN et d'activer les polymérases de type « hot-start » en chauffant à 95°C pendant 5 min. L'amplification des amplicons se fait dans un thermocycleur durant les cycles de PCR qui contient 3 étapes. En premier lieu, l'étape de dénaturation qui permet la séparation des brins d'ADN après chauffage à 95°C pendant 30 sec. Ensuite, l'étape d'hybridation, l'ADNg est chauffé de 55°C à 65°C pendant 30 sec, les amorces se fixent sur l'ADNg matrice. La température exacte d'hybridation doit être déterminée au préalable afin de trouver la température la plus spécifique en fonction du couple d'amorces. Enfin, l'étape d'élongation permet la synthèse du nouveau brin d'ADNg par la polymérase, durant cette étape l'ADN est chauffé à 72°C pendant 30 sec. Il y a un enchaînement de 30 cycles de PCR. Pour finaliser la PCR, une dernière étape d'élongation est réalisée à 72°C pendant 5 min.

Les amorces pour réaliser la PCR du gène *Osgep* pour le génotypage sont mOsgep_FVB_R325Q_F/R situées de part et d'autre de la région contenant la mutation dans l'exon 11 de *Osgep* et à une température d'hybridation à 66°C. De la même manière, la région génomique de

l'exon 3 de *Lage3* est amplifiée par PCR avec le couple d'amorce mLage3_FVB_F137S_F/R dont la température d'hybridation est de 61°C (**Tableau 5**). Les produits d'amplification sont migrés en fonction de leur taille sur un gel d'agarose 1,5 %, la taille des produits PCR étant de 432 pb pour les guides *Osgep* n°245 et n°255, et de 398 pb pour les guides *Lage3* n°94 et n°95.

Lignée	Nom	Séquence de l'amorce
0	mOsgep_FVB_R325Q_F	GTTTCAGGCTGGGCACAGG
Usgep	mOsgep_FVB_R325Q_R	TGTCAGCGAAGAGGGCAGTC
1	mLage3_FVB_F137S_F	GCAGTACAGTGGATGCCTGA
Lage3	mLage3_FVB_F137S_R	TGCTTAGGAGGAGACGGAGA

Tableau n°5 : Séquence des amorces utilisées pour réaliser les PCR des blastocystes injectés.

La PCR permettant d'amplifier l'exon 4 de *Osgep* a été réalisée avec les amorces mOsgep_FVB_OS4A_F/R situées autour de la région où la base a été délétée dans l'exon 4 de *Osgep* et à une température d'hybridation à 61°C (**Tableau 6**).

Lignée	Nom	Séquence de l'amorce
Osgep	mOsgep_FVB_OS4A_F	TGTGGTTTTCTTGAGACAGC
	mOsgep_FVB_OS4A_R	TACACATGGACAGACACATT

Tableau n°6 : Séquence des amorces utilisées pour réaliser la PCR Os4A.

Afin de discriminer les différents génotypes, le produit PCR est digéré par une enzyme de restriction. Le site enzymatique n'est présent que si le ssODN a été intégré par recombinaison homologue (RH) dans l'ADNg de la souris et a été transmis à la descendance. La réaction de digestion se compose du tampon 1X, 1U d'enzyme qui est ajoutée au 10 µL du produit PCR puis incubée à 37°C pendant 30 min. Les produits de digestion sont migrés sur gel d'agarose 1,5 % contenant du BET (GEPBET02-AF) agent intercalant à l'ADN qui s'insère entre les bases complémentaires de l'ADN et permet de visualiser les fragments d'ADNg. Une fois inséré et exposé aux UV, il devient fluorescent. Le gel d'agarose permet la séparation de l'ADN en fonction de sa taille : plus le fragment est petit et plus il migrera vite dans le gel.

6. Séquençage Sanger

Le séquençage selon Sanger permet de connaître avec exactitude les bases qui composent une séquence d'ADN. Des désoxyribonucléotides (dNTP) ainsi qu'une faible quantité de didésoxyribonucléotides (ddNTP) sont mélangés dans le mix réactionnel. Les quantités de dNTP et de ddNTP sont calculées pour que la polymérase incorpore un ddNTP à chaque position de la séquence.

Les ddNTPs agissent comme des terminateurs de chaînes car la fonction alcool de leur carbone 3' a été remplacée par un hydrogène. Aucun nucléotide ne peut donc se lier à un ddNTP. Chaque ddNTP est également marqué par un fluorochrome différent ce qui permet de connaître la base qui a été incorporée à cette position. Après amplification du fragment d'intérêt par PCR, une réaction de purification d'Exosap doit être réalisée pour éliminer les réactifs de PCR qui n'ont pas été consommés (dNTP, amorces) lors de la réaction de PCR. 5 µL de produits PCR sont ajoutés à 3 µL d'Exosap (VWR, US77720) le tout est incubé à 37°C pendant 30 min puis à 85°C pendant 10 min. La réaction de séquence est réalisée avec le 5 µl de produit exosap purifié, 2 µl de Big Dye Sequencing (kit V3.1 Life Technologies, 4337456), 2 µL de Tampon Big Dye et 1 µM d'amorce. La réaction de séquençage se déroule en deux étapes. L'étape de dénaturation qui permet la séparation des brins d'ADN après chauffage à 95°C pendant 30 sec. Ensuite l'étape d'hybridation durant laquelle l'amorce se place sur l'ADNg matrice, puis à l'étape d'hybridation la polymérase incorpore de manière aléatoire un dNTP ou ddNTP marqué par un fluorochrome. Durant cette étape l'échantillon est chauffé à 60°C pendant 1min. Les échantillons sont purifiés sur colonne de Séphadex (Sigma, G5050-100G). Cette étape permet d'éliminer les réactifs en excès de la réaction de séquence (dNTP, ddNTP, amorces). L'électrophorèse capillaire est réalisée sur le séquenceur automatique (Hitachi, 3500XL). Les séquences sont analysées à l'aide du logiciel Séquencher et les changements de bases sont étudiés à l'aide d'une séquence de référence issue de la base de données d'Ensembl (https://www.ensembl.org/index.html).

7. <u>Histologie rénale et cérébrale</u>

Après sacrifice de la souris par dislocation cervicale, le cerveau et les reins sont prélevés. Les organes sont coupés dans le sens sagittal pour le cerveau et longitudinal pour le rein. Les organes sont fixés en PFA (pour paraformaldéhyde) 4 % pendant 12 h puis envoyés à la plateforme d'histologie de Broussais pour réaliser l'inclusion des tissus en paraffine ainsi que les coupes et les différentes colorations.

8. SDS-page au bleu de Coomassie

Cette technique permet de révéler l'ensemble des protéines contenues dans l'échantillon grâce au colorant du bleu de Coomassie. 4 µL des urines de souris sont mélangées au bleu de charge Laemmli 2X (1X) puis chauffé à 95°C pendant 10 min. Les échantillons sont ensuite déposés et migrés sur un gel d'acrylamide SDS-PAGE 10 % pendant 1 h 15 à 100 V. Les contrôles positifs 2 µg et 8 µg de BSA (albumine de sérum de veau) sont également déposés afin d'estimer la quantité de protéines présentes dans les urines de souris. La coloration du gel se fait par ajout d'une solution de bleu de Coomassie (Sigma, B6529) pendant 12 h à température ambiante et sous agitation constante. Les

protéines sont révélées par décoloration du gel avec une solution de décoloration contenant 20 % d'éthanol et 10 % d'acide acétique pendant plusieurs heures jusqu'à l'apparition des protéines.

9. Extraction d'ARN et RT-qPCR

L'extraction des ARN totaux à partir des tissus de cerveau et de reins de souris a été réalisée à l'aide du TRIzol (TermoFisher, 15596026). Le TRIzol est une solution de phénol et d'isothiocyanate de guanidine conçue pour, après ajout de chloroforme, isoler dans des fractions séparées l'ARN (phase aqueuse), l'ADN (interphase) et les protéines (phase organique). Les tissus sont broyés dans 2 mL de TRIzol puis incubés à température ambiante pendant 10 min, et 400 μ L de chloroforme sont ajoutés. Les échantillons sont vortexés puis incubés à température ambiante pendant 15 min. Ensuite, ils sont centrifugés à 10 000 g pendant 15 min à 4°C pour séparer les différentes phases. Une phase organique contenant les protéines ainsi que les lipides, l'interphase contenant l'ADN et la phase aqueuse avec les ARNs. La phase aqueuse est précipitée avec 3 ml d'isopropanol à -80°C pendant 1 heure puis centrifugée à 10 000 g pendant 15 min à 4°C. Le culot d'ARN obtenu est lavé deux fois avec 500 µL d'éthanol à 75 %, séché à température ambiante puis re-suspendu dans 50 µL d'eau sans RNase. Chaque échantillon d'ARN est dosé par spectrophotométrie au Nanodrop (Nanodrop 2000). L'ARN absorbe à une longueur d'onde de 260 nm. Les contaminants comme les protéines, sels et solvants sont également dosés. Ils absorbent respectivement à 280 nm et 230 nm. L'appareil calcule le ratio de la densité optique (DO) à 260 nm et 280 nm (DO 260/DO 280) afin de tester la contamination de l'échantillon par les protéines, une valeur proche de 2 est attendue pour ce ratio. Un ratio DO 260/ DO 230 pour déterminer la contamination en sels est également calculé, une valeur de 2,2 est attendue pour ce ratio. La concentration en ng/ μ L est ensuite déterminée à l'aide de la formule suivante : DO 260 x 40 x V_{final}.

La réaction de Reverse-Transcription (RT) permet de synthétiser un brin d'ADN complémentaire à l'ARN. L'association de l'ARNm et du brin complémentaire est appelée ADN complémentaire (ADNc). Un microgramme d'ARN utilisé pour faire la réaction de RT est traité à la DNase pour éliminer toute trace d'ADNg pendant 30 min à 37°C. Après dénaturation à 70°C de l'ARN pour éliminer les structures secondaires, la synthèse de l'ADNc est réalisée par l'ajout de dNTP (1,25mM), DTT (20nM), amorces aléatoires (10ng/µL), rnazine (1U), le tampon de réaction (1X) ainsi que l'enzyme de transcription inverse (2,5U) dans un volume total de 40 µL. La réaction est effectuée à 42°C pendant 1 h puis chauffée à 95°C pendant 5 min pour inactiver la transcriptase inverse (Invitrogen, 11904018)

La PCR quantitative (qPCR) est réalisée grâce à un appareil de PCR quantitative de type Mx3000P QPCR System (Agilent) qui permet de mesurer le nombre d'amplicons d'ADN présents dans l'échantillon. Cette technique repose sur l'incorporation du SyberGreen dans le petit sillon de l'ADN double brin. Lorsqu'il est inséré il émet une fluorescence à 520 nm. La réaction de qPCR contient le mix SyberGreen Green Power Syber (1X) (Applied Biosystem, 190691), une amorce sens ainsi qu'une antisens entre 70nM et 150 nM puis 2 µL ADNc dilués au 1/10 dans un volume de 20 µl. La concentration exacte d'amorce doit être déterminée au préalable afin de déterminer la concentration d'amorce la plus efficace pour amplifier la région du ADNc choisie. L'amplification des fragments de PCR se fait durant le cycle de la qPCR qui comporte 3 étapes de 40 cycles : une étape de dénaturation qui permet la séparation des brins d'ADNc après chauffage à 95°C pendant 30 sec. Ensuite une étape d'hybridation, à 60°C pendant 30 sec durant laquelle les amorces s'apparient sur l'ADNc matrice. Enfin l'étape d'élongation à 72°C pendant 10 sec qui permet la synthèse du nouveau brin d'ADNc par la polymérase.

Les amorces de RT-qPCR ont été choisies de manière chevauchante sur une jonction entre deux exons pour d'éliminer des hybridations non spécifiques sur l'ADN génomique murin et avec une température d'hybridation de 60°C (**Tableau 7**).

Lignée	Nom	Séquence de l'amorce
Osgep et Lage3	mOsgep_qPCR_F	GTGGGAAACTGCCTGGATCG
	mOsgep_qPCR_R	TTGCCTCGCTTTGCCATCTG
	mLage3_qPCR_F	AGATTCTCCCTCTTCGTGCCT
	mLage3_qPCR_R	AGCTCCTTCCCTACCAGTCC
	mTP53RK_qPCR_F	TGCACGACCAAGACCTCATT
	mTP53RK_qPCR_R	AAGCTCAGCCCAAAGTCGAT
	mTPRKB_qPCR_F	ACAAGTACCACAGGAACACCT
	mTPRKB_qPCR_R	TATATCTTCTTGACTTCCGAGAGCC
	mGon7_qPCR_F	GACGACGCTTTGGATGGTGAT
	mGon7_qPCR_R	GATGCTGGCTTTGGACGTTTT
	mYRDC_qPCR_F	TGAACCCCTTTACTCGTCTTGT
	mYRDC_qPCR_R	TAGTGAGTGCAAGTGGTCCC

Tableau n°7 : Séquence des amorces utilisées pour réaliser les RT-qPCR des 5 membres du complexe KEOPS.

La fluorescence émise est lue à chaque fin de cycle. Le cycle où la quantité des amplicons dépasse le bruit de fond est appelé cycle seuil (threshold cycle Ct), cette valeur marque le début de l'amplification en phase exponentielle des amplicons. Cette phase exponentielle se poursuit jusqu'à épuisement des réactifs. Lorsqu'il n'y a plus d'amplification c'est la phase stationnaire. L'analyse des échantillons doit toujours se faire en phase exponentielle et par rapport à un gène de référence qui ne doit pas varier dans les conditions de l'expérience. Les gènes de référence choisis sont souvent des gènes fortement exprimés dans tout type cellulaire comme l'actine, le glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) ou l'hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase (HGPRT). L'expression relative du

gène d'intérêt est calculée suivant la méthode du 2 $\Delta\Delta$ Ct. Le Ct correspond au nombre de cycle minimal pour lequel l'ADN amplifié est détectable par rapport au bruit de fond. Plus la valeur de Ct est petite, plus la quantité d'ADN présente dans l'échantillon est élevée. Afin d'obtenir une valeur relative du taux d'expression du gène d'intérêt dans un échantillon donné, la quantité du gène cible est d'abord normalisée par rapport à celle d'un gène de référence *HPRT* par exemple, la valeur Δ Ct est ainsi obtenue pour chaque échantillon. Ensuite, pour chaque échantillon, la valeur du Δ Ct est comparée à celle du Δ Ct obtenue pour l'échantillon calibreur (par exemple l'échantillon issu de la condition WT), ce qui nous permet de calculer une valeur de $\Delta\Delta$ Ct. Dans chaque échantillon, l'expression relative du gène cible par rapport à l'échantillon de référence est calculé par la formule RE = 2^{- $\Delta\Delta$ Ct}.

10. Construction des plasmides contenant les shARN

Les séquences des molécules d'ARN en épingle à cheveux (appelé shRNA) ont été choisies sur les sites Sigma-Aldrich et BLOCK-iT RNAi Designer puis synthétisés par Eurogentec. Les sites de restrictions enzymatiques BamHI et XhoI ont été ajoutés de part et d'autre des extrémités des shRNA pour réaliser le clonage. Le clonage des sh se réalise par oligodimérisation. Les oligonucléotides (20µM) sont incubés à 95°C pendant 5 min dans le tampon Neb 2.0 (New England BioLabs, B7202S) et laissés à température ambiante pendant 2h, cette étape permet de détruire les structures secondaires de l'ARN et d'apparier correctement les deux oligos ensemble. Les oligos dimérisés sont insérés dans le vecteur pSuper (oligoengine) par coupure avec les enzymes de restrictions BamHI et XhoI à l'aide de la T4 DNA ligase. Le mix de ligation contient du tampon T4 ligase (1X), 500ng de le vecteur digéré, 1 µL de l'enzyme T4 ligase ainsi que les oligo appariés (2 µM). Cette réaction se fait dans un volume final de 20 µL. La réaction est incubée à 22°C pendant 20 min. La ligation est transformée dans des bactéries compétentes (XL2 blue chimiocompetente bacteria, 200150). Les plasmides contenus dans les bactéries formant les colonies sont extraits par lyse alcaline grâce au kit miniprep (Promega, A1460). Les clones sont sélectionnés par digestion enzymatique avec l'enzyme HindIII. Le site de restriction de cette enzyme est éliminé par l'insertion du shRNA dans le vecteur. Les plasmides ayant le bon profil de digestion sont vérifiés par séquençage sur la plateforme de génomique de l'institut Cochin.

11. Culture cellulaire et co-transfection des plasmides dans les IMCD

Les cellules IMCD (Primary cultured inner medullary collecting duct) sont des cellules rénales murines du tube collecteur. Elles sont cultivées dans les mêmes conditions que les HEK293T mais dans le milieu DMEM F12 1X complet (ThermoFisher, 21331-046). Une quantité de 1,5 million de cellules par conditions est ensemencée dans une boite de 15 cm (B15). Les plasmides pSuper (contenant le shRNA) et le plasmide pCAG-GFP (contenant la GFP) sont co-transfectés avec 90 µl Lipofectamine 2000

et 30 µg de plasmide de la même manière que les HEK293T. Après 48 h de transfection, les cellules sont trypsinées puis rincées dans du tampon FACS (2,5 mM EDTA et 2,5 % de SVF qsp PBS 1X). Les cellules sont resuspendues dans un volume de 600 µl de tampon FACS puis filtrées à 35 µm. Les cellules GFP positives sont triées par le FACS SH800 de la plateforme de cytométrie de flux de l'Institut Imagine. Les cellules GFP positives sont récoltées dans un tube de récupération puis rincées en PBS 1X avant congélation à -80°C. L'ARN des cellules GFP positives est isolé par une extraction au Trizol puis une RT-qPCR est réalisée afin de vérifier l'extinction des ARNm des gènes du complexe KEOPS contre lesquels sont dirigés les shARN.

12. Électroporation in utero

L'électroporation *in utero* est une technique qui permet l'étude des mécanismes moléculaires qui régissent la prolifération, la différenciation, la migration et la maturation des cellules à des stades de développement embryonnaire précoce. La souris gestante est anesthésiée et la partie de utérus contenant les embryons est sortie (E13). L'injection de matériel génétique se fait en utilisant des impulsions électriques afin de créer des pores temporaires dans les membranes cellulaires, sur la zone choisie (par exemple le cerveau). Les embryons de souris sont sacrifiés trois jours à après l'électroporation (E16). Cette méthode expose les cellules à de très hauts voltages qui entraînent la mort de 30 % des embryons. Afin de pallier cette mortalité accrue, nous avons choisi le fond génétique Swiss, qui ont de grandes portées car elles ne sont pas issues de lignées consanguines.

13. Statistiques

Les quantifications ont été réalisées sur au moins cinq expériences indépendantes avec le test statistique adéquat (test de Student ou test de Wilcoxon Mann-Whitney) grâce au logiciel GraphPad Prism version 5. Pour toutes les figures : ns, non significatif, * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001.

D. <u>Résultats</u>

1. Étude *in vitro* de la stabilité du complexe KEOPS

Nos études *in vitro* s'intéressent à l'interaction de deux membres du complexe KEOPS, les protéines LAGE3 et GON7 dont les orthologues chez la levure sont connus pour interagir et former des dimères (Mao et al., 2008). Au cours de nos études sur les interactions entre les différents membres du complexe, nous avons fusionnée les protéines GON7 et LAGE3 aux étiquettes 2HA et V5. Les étiquettes permettront de reconnaitre GON7 et LAGE3 en utilisant un anticorps dirigé contre l'étiquette (respectivement YPYDVPDYAYPYDVPDYA et GKPIPNPLLGLDST pour l'étiquette 2HA et V5). Lorsque GON7 et LAGE3 sont co-exprimées dans les cellules HEK293T, leur niveau d'expression protéique est augmenté par rapport à la condition où chacune est exprimée seule (**Figure 36-A**). Cette

augmentation du niveau protéique est deux fois supérieure pour LAGE3 et 5 fois supérieure pour GON7 (**Figure 36-B**). Ces résultats suggèrent que l'interaction de LAGE3 et GON7 permet une stabilisation de chacune des protéines, elles sont donc moins facilement dégradées. Ces résultats sont en accord avec les résultats obtenus par nos collaborateurs qui ont montré par des études structurales que la forme tertiaire de GON7 devient plus structurée lors de son interaction avec LAGE3, confirmant que la formation du complexe GON7/LAGE3 stabilise les deux protéines (voir **Annexe 2**).



Figure n°36 : Effet de la co-expression des protéines GON7 et LAGE3 sur leur niveau d'expression protéique.

(A) Les cellules HEK293T ont été transfectées avec la construction 2HA-GON7, V5-LAGE3 seule ou avec 2HA-GON7 et V5-LAGE3 ensemble. Les immunoblots ont été réalisés avec les anticorps anti-HA et anti-V5 pour révéler les protéines GON7 et LAGE3, respectivement, et avec l'anticorps anti α -tubuline qui sert de contrôle de charge. Ces résultats ont été observés sur 3 expériences indépendantes (n=3). (B) Quantification du niveau d'expression relative des protéines GON7 et LAGE3 à partir des immunoblots en A. Le niveau d'expression de LAGE3 et GON7 est normalisé à celui de l' α -tubuline. Le T0 correspond à la condition sans traitement à la cycloheximine.

Afin d'étudier la stabilité de ces deux protéines, nous avons réalisé des expériences de mesure de la demi-vie en utilisant la cycloheximide, un inhibiteur de la synthèse protéique, dans des cellules HEK293T exprimant transitoirement soit 2HA-GON7 ou V5-LAGE3 seul, soit co-exprimant les deux protéines marquées. La cycloheximide est utilisée dans le milieu de culture à la concentration de 100µg/ml pendant une durée de 0.5, 1, 2, 4 et 6 heures. Après extraction des protéines et un immunoblot avec les anticorps anti-HA et/ou anti-V5, nous visualisons la dégradation des protéines LAGE3 et GON7 au cours du temps (**Figure 37**). Lorsqu'elles sont exprimées seules, les niveaux de protéines GON7 et LAGE3 sont diminués, ce qui suggère que les deux protéines sont instables en l'absence de leur partenaire. Nous avons constaté que le niveau d'expression de GON7 diminue plus rapidement que celui de LAGE3, avec une diminution de 50 % de la quantité de protéine en 1 h après ajout de la cycloheximide pour GON7 contre 6 h pour LAGE3 (**Figure 37-A, B et E**). En revanche, lorsque les deux protéines sont co-exprimées, il n'y a pas de diminution du niveau d'expression qui reste stable

suggérant que l'interaction a stabilisé les deux protéines (**Figure 37-C, D et E**). Puis, nous nous sommes demandé si l'absence de GON7 avait également un impact sur la stabilité de l'ensemble du complexe KEOPS. En effet, nous avons pu démontrer que les niveaux de protéines des quatre sous-unités KEOPS étaient diminués dans les cellules d'individus mutés pour GON7, alors qu'ils n'étaient pas affectés dans les cellules d'individus porteurs de mutations dans le gène *OSGEP* ou le gène *WDR73*. Ce dernier étant également responsable d'un GAMOS dans un sous-groupe de patients cliniquement homogène mais dont la fonction n'est pas liée à la biosynthèse de t⁶A (Colin et al., 2014) (**Figure 37-F**). Nous avons démontré que cette diminution du niveau de protéines n'était pas due à une régulation transcriptionnelle (voir **Annexe 2**). D'autre part, nos résultats ont également montré que le niveau de t⁶A était diminué dans les cellules issues des patients porteurs de mutations dans les gènes *YRDC*, *OSGEP* et dans une moindre mesure *GON7* (voir **Annexe 2**).

L'ensemble de nos résultats montrent donc que l'absence de GON7 affecte la stabilité du complexe KEOPS, entraînant une diminution du niveau d'expression des quatre sous-unités, avec pour conséquence une diminution de la biosynthèse de t⁶A. Cependant, il reste de nombreuses études à réaliser pour comprendre pourquoi la diminution du niveau de t⁶A est plus délétère dans le rein et le cerveau.





(A) Cellules HEK293T exprimant soit 2HA-GON7 (A) ou V5-LAGE3 seul (B) ou co-exprimant les deux protéines (C et D) puis traitées à la cycloheximide (CHX) pour observer la dégradation protéique (100 μM pendant 30 min, 1 h, 2 h, 4 h et 6 h). Les protéines GON7 et LAGE3 sont révélées par les anticorps anti-HA (A et C) et anti-V5 (B et D), respectivement. L'α-tubuline est utilisée comme contrôle de charge protéique. (E) Représentation des données expérimentales sous forme de courbe de décroissance exponentielle. Résultats normalisés par rapport à l'α-tubuline. (F) Analyse par western blot du niveau d'expression protéique des cinq sous-unités KEOPS dans des lignées cellulaires lymphoblastoïdes de deux parents non affectés (A.II-1 et A.II-5), quatre individus avec la mutation GON7 p.Tyr*7 (A.II-3, A.II-4, B.II-4 et (C.II-2), un individu avec les mutations OSGEP p.Arg325Gln et p.Arg280His (individu «N2705» décrit dans Braun et al., 2017), et un individu avec un GAMOS lié aux mutations du gène *WDR73* (WRD73 p.Tyr43*, individu A.II-4 décrit dans Colin et al., 2014). Les expériences ont été répétées 3 fois.

2. Étude in vivo du complexe KEOPS chez la souris

- a) Génération de deux lignées de souris knock-in (KI) par CRISPR/Cas9
 - (1) Validation des guides sur les blastocystes

Nous sommes l'une des premières équipes, à l'Institut Imagine, à avoir utilisé la technique CRISPR/Cas9 pour créer des modèles murins KI, en étroite collaboration avec Pierre DAVID de la plateforme de transgénèse. Brièvement, cette méthode permet d'insérer dans le génome de l'espèce choisie une ou des mutations par recombinaison homologue en utilisant l'endonucléase Cas9 qui coupe de façon spécifique une région du génome grâce à un ARN guide (ARNg) complémentaire à la séquence ADN ciblée, et un ADN simple brin (ssODN) contenant la ou les mutations désirées. La coupure par l'endonucléase s'effectue trois bases en amont d'une séquence présente sur l'ADN cible : la séquence PAM de type « NGG » pour la Cas9, où N peut être n'importe quel nucléotide (voir **Matériels et Méthodes**).

Nous avons participé sur la plateforme de transgénèse à la mise au point technique d'une étape permettant de vérifier l'efficacité des guides au stade embryonnaire « blastocyste », permettant ainsi de sélectionner le ou les meilleurs guides avant de commencer l'expérimentation finale qui permettra d'obtenir les animaux KI. Pour cela, nous avons choisi 4 ARN guides, 2 pour le gène *Osgep* (guides n°245 et n°255) et 2 pour le gène *Lage3* (guides n°94 et n°95) (**Figure 38**).

A
Coupure guide n°245 Coupure guide n°255 agttttcccattttccgcagGTATAGGACAGATGAAGTGGAAGTGACATGG- Séquence Osgep WT
ttcccattttccgcagGTATAGG - Guide n°255 Guides CRISPR Osgep
В
Coupure guide n°94 Coupure guide n°95 GCTTTCCCTAGTGGTGAACACCATACAGCTCTTTGGGGCCCCCAGTTTCCT - Séquence Lage3 WT
GTGAACACCATACAGCTCTTTCGG - Guide n°94 TGAACACCATACAGCTCTTTGGG - Guide n°95

Figure n°38 : Alignement entre la séquence WT et les quatre guides choisis grâce au logiciel CRISPOR-tefor.

(A) Guides n°245 et n°255 choisis pour *Osgep*. Les séquences exoniques sont représentées en majuscules et les séquences introniques en minuscules. La séquence soulignée correspond à la séquence du guide choisi sur CRISPOR (en rouge pour le n°245 et en bleu pour le n°255) qui va reconnaître la séquence ADN murin cible. La séquence soulignée en rouge équivaut au codon WT muté dans le ssODN. (B) Guides n°94 et n°95 pour *Lage3*. La séquence soulignée correspond à la séquence du guide choisi sur CRISPOR (en bleu pour le n°94 et en rouge pour le n°95) qui va reconnaître la séquence du guide choisi sur CRISPOR (en bleu pour le n°94 et en rouge pour le n°95) qui va reconnaître la séquence ADN murin cible. Les éclairs rouges indiquent le site de coupure de la Cas9 en fonction de la séquence PAM (surlignée en violet) présente sur l'ADN génomique ciblé.
Les gènes *Osgep* et *Lage3* étant conservés à 95 % entre les espèces humaines et murines, nous avons reproduit deux mutations identifiées chez un patient portant la mutation *OSGEP*, c.974 G>A p.R325Q et chez un autre patient portant une mutation dans le gène *LAGE3* c.410 T>C p.F137S. Le gène *LAGE3* étant sur le chromosome X et le GAMOS étant une maladie récessive, seuls les hommes porteurs de mutations de *LAGE3* (hémizygotes) sont atteints, alors que les femmes (hétérozygotes) sont saines. Aucune femme homozygote pour des mutations de *LAGE3* n'a été identifiée, suggérant que cette condition est létale, cependant il y a trop peu de patients atteints pour conclure. Nous avons choisi les guides n°245 et n°255 situés dans l'exon 11 d'*Osgep* dont le site de coupure est respectivement à 4 et 3 paires de base de la mutation ciblée. Pour le ssODN *Osgep*, nous avons introduit la mutation faux-sens AGG en CAG conduisant à la variation protéique Osgep p.R325Q et modifié la base T du codon TAT par une mutation silencieuse permettant ainsi d'introduire un site enzymatique de restriction Kpnl : GGTACC (**Figure 39**). Ce site de restriction nous permettra de génotyper plus rapidement les animaux.

Coupure guide n°245 Coupure guide n°255 ...CgCagGTATAGGACAGATGAA... Osgep WT -intron- -Y--R--T--D--E-...CgCagGTACCAGACAGATGAA... ssODN Osgep R325Q -intron- -Y--Q--T--D--E-

Figure n°39 : Schéma de la partie du ssODN Osgep portant la mutation AGG (R) en CGG (Q) et le site Kpnl (GGTACC).

Les séquences exoniques sont représentées en majuscules et les séquences introniques en minuscules. La séquence en gras correspond à la séquence WT alors que la séquence mutée CAG en rouge équivaut à la variation protéique p.R325Q. La séquence soulignée correspond au site de restriction KpnI (GGTACC), la séquence en bleu met en évidence la mutation silencieuse utilisée. Les éclairs rouges mettent en évidence le site de coupure de la Cas9 en fonction du guide utilisé. La séquence protéique est visualisée sous la séquence (code à une lettre).

Pour le gène *Lage3*, la mutation se situe à la fin de l'exon 3, nous avons donc choisi les guides n°94 et n°95 qui ont un site de coupure situé, respectivement, à 2 et 1 paire de bases de la mutation d'intérêt. Nous avons procédé de manière similaire pour le ssODN *Lage3*, le changement de base CTTT en GTCC crée deux sites de restrictions Pvull (CAGCTG) et Hpall (CCGG) ainsi que la mutation TTT en TCC conduisant à la variation protéique Lage3 p.F137S (**Figure 40**). L'enzyme Hpall étant sensible à la méthylation CpG nous avons utilisé l'enzyme Pvull pour les futures expériences.

...ATACAGCTCTTTGGGGCCCCCA... Lage3 WT -I--Q--L--F--G--P--P-...ATACAGCTGTCCGGGCCCCCA... ssODN Lage3 F137S -I--Q--L--S--G--P--P-

Figure n°40 : Schéma de la partie du ssODN Lage3 portant les mutations GTCC conduisant à l'apparition du site Pvull (CAGCTG) et Hpall (CCGG) ainsi que la mutation TTT (F) en TCC (S).

Les séquences soulignées correspondent respectivement aux sites de restrictions KpnI (CAGCTG) et HpaII (CCGG). La séquence mutée CAG en rouge équivaut à la variation protéique p.F137S alors que la séquence WT est en gras. La séquence en bleu met en évidence la mutation silencieuse. Les éclairs rouges mettent en évidence le site de coupure de la Cas9 en fonction du guide utilisé. La séquence protéique est visualisée sous la séquence (code à une lettre).

Nous avons réalisé la micro-injection de 15 zygotes murins au stade une cellule pour les deux guides *Osgep* (n°245 et n°255) et leurs ssODN respectifs. Pour les guides *Lage3* n°94 et n°95, 12 et 11 zygotes ont été injectés, respectivement. Deux zygotes ne sont pas arrivés au stade blastocyste pour les zygotes injectés avec le guide *Osgep* n°255 et trois pour ceux injectés avec le guide *Osgep* n°245 (**Figure 41-A**). De la même manière, quatre zygotes ne se sont pas développés jusqu'au stade blastocystes pour les guides *Lage3* n°94 et n°95.

Après injection des zygotes par le mix CRISPR (contenant un guide ARNg, la Cas9 et le ssODN), nous avons extrait l'ADN des blastocytes (3,5 jours après l'injection, au stade blastocyste, il y a environ 100 cellules) pour obtenir assez d'ADN pour effectuer les PCR avec des amorces situées de part et d'autre de la mutation ciblée (à la fin de l'exon 11 pour *Osgep* et de l'exon 3 pour *Lage3*). Après vérification des produits d'amplification sur gel d'agarose (**Figure 41-B**), nous avons séquencé les amplicons PCR afin de vérifier plus en détails si l'insertion du ssODN a eu lieu dans l'ADN génomique des blastocystes de façon correcte, sans autre mutation/délétion.



Figure n°41 : PCR Osgep et Lage3 sur les blastocystes injectés avec les guides CRISPR

(A) Injection des guides n°245 ou n°255 et (B) des guides n°94 et n°95. Les abréviations sont T- pour témoin négatif de PCR, T+ pour témoin positif de PCR et Mq pour le marqueur de taille.

Pour chaque guide, nous avons obtenu deux types de séquences : soit la séquence ne présente que des simples pics et est identique à la séquence de référence TATAGG (la séquence 1) qui correspond à un génotype WT, soit la séquence présente des doubles pics correspondant à la séquence WT (TATAGG) et à la séquence modifiée par l'insertion du ssODN (TACCAG, séquence 2, **Figure 42-A**). Ainsi, pour le guide *Osgep* n°245, nous avons obtenu 50 % de séquences WT et 50 % d'hétérozygotes alors que pour le guide n°255, nous n'avons obtenu que 15 % d'hétérozygotes. Nous avons donc choisi de garder le guide n°245 qui paraissait plus efficace. De la même façon, pour le gène *Lage3*, soit la séquence CTCTTT est observée, correspondant à un profil WT, soit la séquence a des doubles pics avec la séquence supplémentaire CTGTCC qui correspond à un profil où le ssODN a été inséré (**Figure 42-B**). Nous avons obtenu 50 % de WT et 37 % d'hétérozygotes pour guide n°94 et 50 % WT et 37 % hétérozygotes pour guide n°95. Nous avons gardé le guide n°95 car il est plus proche de la mutation. L'ensemble des résultats obtenus sur les blastocystes sont présentés dans le tableau ci-dessous (**Tableau 8**).



Figure n°42 : Séquençage Sanger des blastocystes WT et hétérozygotes

(A) Blastocystes injectés avec les guides n°245 et n°255 pour *Osgep*. (B) Blastocystes injectés avec les guides n°94 et n°95 pour *Lage3*.

Lignées	Guides (ARNg)	Nbre zygotes injectés	Nbre blastocystes obtenus	PCR ayant fonctionnés	Nbre de séquences WT	Nbre de séquences hétérozygotes	Autre type de séquence (mosaïque)	% de séquences WT	% de séquences hétérozygotes
Osgep	Guide n°245	15	12	11	5	6	0	45	55
	Guide n°255	15	13	13	11	2	0	85	15
Lage3	Guide n°94	12	8	8	4	3	1	50	38
	Guide n°95	11	8	8	4	3	1	50	38

Tableau n°8 : Résultats de génotypage des blastocystes pour les quatre guides choisis.(2)Génération des lignées KI

Nous avons choisi les guides n°245 (lignée *Osgep*) et n°95 (lignée *Lage3*) pour établir les lignées KI sur un fond génétique FVB/N car ce fond est sensible aux atteintes glomérulaires (Terzi et al. 2000; Hovatta et al. 2007) et les portées sont relativement grandes (environ 10 souriceaux par portée). La

première portée de souris obtenue après la transgénèse est appelée FO. Nous avons injecté quinze zygotes au stade une cellule dans trois souris pseudo-gestantes et obtenu vingt-six naissances (**Tableau 9**).

Lignées	Guides (ARNg)	Nbre zygotes injectés	Nbre blastocystes implantés	Nbre de souriceaux obtenus	PCR ayant fonctionnés
Osgep	Guide n°245	15	13	13	13
Lage3	Guide n°95	15	13	13	13

Tableau n°9 : Nombre d'animaux obtenu à la génération F0.

Afin de connaître le génotype de ces souris F0, nous avons extrait l'ADN issu de la biopsie de queue et utilisé les mêmes conditions de PCR que celles décrites précédemment, suivi d'une digestion enzymatique spécifique du site enzymatique présent dans chaque ssODN.

La taille attendue des fragments de digestion en fonction des génotypes est indiquée dans la **Figure 43-A**. Nous avons obtenu 5 souris sans insertion (WT) et 7 souris ayant le ssODN inséré sur l'un des allèles. Le puits 9 présente un profil inattendu, il est possible que l'ADN génomique ait subi des remaniements au moment de la réparation après coupure par la Cas9 comme des insertions et/ou des délétions. Nous avons donc éliminé cette souris de la liste des géniteurs pour la prochaine génération (**Figure 43-B**). Nous avons décidé de conserver les souris n°4 et n°7 (femelles) comme fondatrices et de les accoupler avec deux mâles de génotype WT pour obtenir la génération suivante (F1).





Les abréviations sont T- pour témoin négatif de PCR et T+ pour témoin positif après digestion par KpnI, Mq : marqueur de taille, Ki het : *Osgep* Ki hétérozygote et Ki hom : *Osgep* Ki homozygote.

Les produits PCR ont été séquencés et nous avons confirmé que les changements de base observés sont bien ceux attendus (de la même manière que les blastocystes décrits précédemment) (Figure 44).



Séquence WT

Séquence hétérozygote

Figure n°44 : Séquençage Sanger de l'ADN des souris WT et porteuses de la variation protéique Osgep p.R325Q (F0)

Afin de génotyper les animaux de la lignée *Lage3* nous avons utilisé la même stratégie, une PCR de l'exon 3 de *Lage3* puis une digestion enzymatique par Pvull. La taille attendue des fragments de digestion en fonction des génotypes est indiquée dans la **Figure 45-A**. Le produit de digestion dans le puits 24 est plus petit que la taille attendue de 398 pb, il semblerait que l'ADN génomique de cette souris ait subi une ou plusieurs délétions après coupure par la Cas9, elle ne sera donc pas utilisée pour la suite des expériences (**Figure 45-B**). Nous avons décidé de conserver la souris n°23 (femelle) hétérozygote pour la mutation comme fondatrice et de l'accoupler avec un mâle dont le génotype est WT pour obtenir la génération suivante (F1).

	Aucune insertion (WT)	Insertion sur un allèle (Ki het)	Insertion sur les deux allèles (Ki hom)
	398	398	/
Lignee Lages	1	326	326
Taille (pb)	1	72	72



Figure n°45 : Tailles attendues des amplicons PCR après digestion par Pvull et PCR puis digestion par Pvull de la région d'intérêt du gène Lage3 à partir de l'ADN génomique murin (F0).

Les abréviations sont T- pour témoin négatif de PCR et T+ pour témoin positif de digestion par Pvull et Mq : marqueur de taille.

Le séquençage des produits PCR nous a permis de montrer que nous avions bien les changements de base attendus (**Figure 46**).



Séquence WT

Séquence hétérozygote

Figure n°46 : Séquençage Sanger des souris WT et de Lage3 Ki hémizygote (FO).

(3) Obtention d'animaux homozygotes pour les lignées Osgep et Lage3

Pour réaliser les lignées de souris *Osgep* et *Lage3* KI, nous avons dans un premier temps réalisé deux accouplements avec les souris femelles issues de la génération F0 (souris fondatrices) et un mâle WT. Cette génération (génération F1), nous a permis de vérifier la transmission de la mutation dans les cellules germinales, d'éliminer les animaux « mosaïques » (porteurs de plusieurs mutations) et d'éliminer des potentiels effets de coupures secondaires (« off-targets ») induits par l'utilisation de la technique CRISPR/Cas9. Pour cette génération F1, le génotypage est réalisé comme pour la génération F0, avec une amplification par PCR de la région contenant la mutation suivie d'une digestion enzymatique.

Pour la lignée *Osgep*, les femelles F0 identifiées comme étant hétérozygotes (n° 4 et n°7) ont été accouplées avec deux mâles WT. Nous attendons donc pour la F1, 50 % de souris WT et 50 % de souris hétérozygotes (**Figure 47-A**). Les animaux issus de la F1 présentant un profil avec 3 bandes sont hétérozygotes pour la mutation *Osgep* et nommés ci-après Osgep Ki het (**Figure 47-B**). Pour cette génération nous avons obtenu 59 animaux dont 47,4 % de génotype WT et 52,6 % de génotype hétérozygote, ce qui est en accord avec les proportions attendues.



Figure n°47 : Représentation schématique des deux premières générations de souris et génotypage par *PCR/digestion des animaux de F1 de la lignée* Osgep.

(A) Croisement réalisé pour obtenir la génération F1. (B) Produits PCR digérés par KpnI, les abréviations sont T- pour témoin négatif de PCR, T+ pour témoin positif de digestion et Mq : marqueur de taille.

Nous avons bien une transmission de la mutation de la génération F0 à la descendance F1 pour les animaux utilisés dans les accouplements, nous allons pouvoir créer la génération F2 dans le but d'obtenir des animaux homozygotes pour la mutation *Osgep*. Nous avons donc accouplé un mâle et une femelle de génotype hétérozygote de la génération F1 mais issus de deux accouplements différents. Trois accouplements ont été effectués en parallèle afin de constituer une cohorte d'animaux homozygotes pour étudier leur phénotype (**Figure 48-A**). Après génotypage des animaux *Osgep* F2 (réalisé de la même façon que pour la F0 et la F1), nous avons obtenu 97 animaux issus des 3 accouplements, dont 35 WT (36,1 %), 41 hétérozygotes (42,2 %) et 21 homozygotes (21,7 %) (**Figure 48-B**). Les fragments PCR obtenus pour les souris homozygotes ont été séquencés pour valider la présence de la mutation (**Figure 48-C**).





(A) Croisement réalisé pour obtenir la génération F2. (B) Produits PCR digérés par KpnI. Les abréviations sont T- pour témoin négatif de PCR, T+ pour témoin positif de digestion et Mq : marqueur de taille. (C) Vérification des génotypes par séquençage Sanger.

Nous avons procédé de la même manière pour la lignée *Lage3*, dans nos accouplements, la transmission de la mutation sera différente selon que le géniteur porteur de la mutation est le mâle ou la femelle. Ici, la femelle F0 identifiée comme étant hétérozygote (n°23) a été accouplée avec un mâle WT (**Figure 49-A**). Les mâles dont le chromosome X porte la mutation conduisant à la variation protéique Lage3 p.F137S sont hémizygotes et nommés ci-après *Lage3* Ki hémi. Ces animaux ont un profil de digestion qui correspondrait à des animaux homozygotes si le gène était sur un autosome avec des fragments de digestion de 326 pb et 72 pb (la dernière bande est très peu visible en raison de sa petite taille). De manière similaire à ce qui a été décrit pour les souris F0, un seul fragment de digestion à 398 pb correspond à un génotype WT pour les animaux présentant ce profil (**Figure 49-B**). Pour cette génération, nous avons obtenu 18 animaux dont 27,8 % de génotype WT, 27,8 % de

génotype hétérozygote et 44.4 % de génotype hémizygote (8 mâles hémizygotes obtenus). Les proportions attendues pour un gène localisé sur le chromosome X sont 25 % d'animaux hétérozygotes et hémizygotes ainsi que 50 % WT. Ici, les valeurs obtenues sont différentes des proportions attendues, cela pourrait s'expliquer par le faible nombre d'animaux analysés.



Figure n°49 : Représentation schématique d'un accouplement et génotypage par PCR/digestion des animaux de la génération F1 pour la lignée Lage3.

(A) Croisement réalisé pour obtenir la génération F1 de la lignée *Lage3*. (B) Produits PCR *Lage3* digérés par Pvull, les abréviations sont T- pour témoin négatif de PCR et T+ pour témoin positif de digestion et Mq : marqueur de taille.

Pour la lignée *Lage3*, les mâles hémizygotes meurent prématurément avant d'atteindre leur maturité sexuelle. Nous avons donc accouplé une femelle porteuse de la mutation à l'état hétérozygote avec un mâle de génotype WT. De façon identique à la lignée *Osgep*, trois accouplements ont été réalisés en parallèle pour créer une cohorte de mâles hémizygotes à étudier (**Figure 50-A**). Après génotypage de la génération F2, nous avons obtenu 68 animaux au total dont 31 WT (45,5 %), 20 hétérozygotes (29,5 %) et 17 hémizygotes (25 %), respectant ainsi les proportions attendues lorsque la femelle est hétérozygote pour la mutation (respectivement 25 % pour les animaux hétérozygotes et hémizygotes ainsi que 50 % pour les animaux WT) (**Figure 50-B**). Les fragments PCR obtenus pour les souris hémizygotes ont été séquencés pour valider la présence de la mutation (**Figure 50-C**).



Figure n°50 : Représentation schématique d'un accouplement et génotypage par PCR puis digestion des animaux de génération F2 pour la lignée Lage3.

(A) Croisement réalisé pour obtenir la génération F2 de la lignée *Lage3*. (B) Produits PCR *Lage3* digérés par Pvull. Les abréviations sont T- pour témoin négatif de PCR et T+ pour témoin positif de digestion et Mq : marqueur de taille. (C) Exemple de séquences WT et *Lage3* Ki hémi.

b) Caractérisation phénotypique des deux lignées de souris KI

(1) Etude macroscopique et survie

Une fois les lignées KI porteuses des mutations protéiques Osgep Ki hom et Lage3 Ki hémi obtenues, nous avons dans un premier temps observé l'aspect général des animaux au cours de leur développement par rapport à des souris contrôles. À 10 mois, les souris *Osgep* Ki hom (n=5) ne présentent pas de différence morphologique au niveau de la taille, ni au niveau de leur aspect général par rapport aux souris WT (n=5) (**Figure 51-gauche**). En revanche, pour les souris *Lage3* Ki hémi (n=5), nous avons observé une différence de taille avec les animaux WT (n=5). Cette différence n'est pas visible à la naissance mais apparait après trois semaines, au moment du sevrage. Les animaux *Lage3* Ki hémi sont plus petits et plus chétifs que les animaux WT (**Figure 51-droite**).



Figure n°51 : Aspect d'une souris Osgep *WT et* Osgep *Ki homozygote à 275 jours et d'une souris* Lage3 *WT et* Lage3 *Ki hémizygote à 55 jours.*

Des mesures de poids ont été effectuées une fois par semaine pendant 4 mois sur des souris WT (n=10) et *Osgep* Ki hom (n=10). Nous n'avons pas observé de différence de poids significative entre les deux cohortes (n=6, **Figure 52-A**). En parallèle, nous avons suivi le taux de survie de ces animaux pendant 10 mois (275 jours) et nous n'avons enregistré aucun décès précoce des animaux *Osgep* Ki hom (n=10) par rapport aux animaux contrôle (n=10, **Figure 52-B**).



Figure n°52 : Courbe de poids (n=10) et de survie (n=10) des animaux Osgep WT et Osgep Ki hom.

La même série d'expérience a été réalisée pour la lignée murine *Lage3*. Les animaux *Lage3* Ki hémi (n=7) prennent très peu de poids comparés aux animaux WT issus de la même portée (n=7). En

1 mois et demi ils prennent 5,4 g en moyenne par rapport à leur poids après le sevrage, contre 11,2 g en moyenne pour un animal WT (**Figure 53-A**). De plus, ces animaux ont une espérance vie réduite avec un taux de survie à 50 % à partir de 60 jours (2 mois, n=7) (**Figure 53-B**).



Figure n°53 : Courbe de poids (n=7) et de survie (n=7) des souris Lage3 WT et Lage3 Ki hémi.

(2) Études biochimiques

Nous avons dans un premier temps réalisé des prélèvements d'urine afin de vérifier si les souris développent une protéinurie, signe d'une anomalie de la fonction rénale. Les urines de souris WT (=7) et Lage3 KI hémi (n=7) ont été prélevées une fois par semaine, puis analysées par électrophorèse en gel de type SDS-PAGE pour séparer les protéines en fonction de leur poids moléculaire. De l'albumine, sous forme d'albumine de sérum bovin (en anglais « Bovine Serum Albumin » ou BSA), est également déposée sur le gel en tant que contrôle positif de taille et de quantité. En effet, cette protéine de 60kDa, présente en grande quantité dans le plasma sanguin, ne franchit la barrière de filtration glomérulaire que lorsque cette dernière est altérée. L'albumine se retrouve donc dans les urines en cas de défaut de filtration du rein. Après migration, les protéines sont révélées par coloration du gel au bleu de Coomassie, la BSA étant bien observée à la taille attendue de 60kDa (Figure 54). A 43 et 46 jours postnatal (environ 1 mois et demi), nous n'avons pas détecté de protéinurie chez les animaux Lage3 Ki hémi. Une bande à la taille de la BSA est détectée dans la première piste du gel, mais nous avons observé plusieurs fois ce phénomène pour différents animaux. De plus, nous n'avons pas observé d'augmentation de l'intensité de cette bande au cours du temps, c'est-à-dire pas d'augmentation de la quantité de cette protéine, comme cela est observé habituellement lors d'une protéinurie. D'autre part, cette bande disparaissait chez certains animaux dans le prélèvement suivant et pouvait être présente chez des animaux WT, suggérant qu'elle pourrait correspondre à une contamination des urines par des cellules de peau ou du sperme lors de leur récolte.



Figure n°54 : Analyse de la protéinurie chez les souris Lage3 Ki hémi et WT à 43 et 46 jours postnatal. Les urines de cinq souris Lage3 Ki hémi et d'une souris WT ont été déposées sur un gel SDS-PAGE 10 %. Le gel a ensuite été coloré au bleu de Coomassie pour révéler les protéines. La BSA (2µg et 8µg) sert de contrôle positif de taille et de quantité.

En effet, dans la littérature, les trois patients décrits atteints de GAMOS et portant la mutation OSGEP p.R325Q à l'état homozygote présentent une tubulopathie avec une perte de calcium, magnésium et potassium dans les urines (Braun et al., 2017b; Chen et al., 2016; Edvardson et al., 2017; Wang et al., 2018). Leur protéinurie est non néphrotique (< à 3g/24h). De façon intéressante, ce sont les seuls patients mutés pour les gènes du complexe KEOPS qui ne présentent pas de syndrome néphrotique. Nous avons donc mesuré la concentration de plusieurs ions (calcium, phosphate, magnésium, potassium, sodium et chlore) et du glucose dans les urines des souris *Osgep* Ki hom et montré qu'il n'y a aucune différence de concentrations en ions et en glucose entre les souris WT (n=8, sauf pour le chlore n=7) et les souris *Osgep* Ki hom (n=9, sauf pour le chlore n=8) (**Figure 55**).



Figure n°55 : Dosages biochimiques de différents ions présents dans les urines des animaux Osgep WT (n=8, sauf chlore n=7) et Osgep Ki hom (n=9, sauf chlore n=8).

(3) Etudes histologiques

Nous avons réalisé des coupes histologiques de cerveaux et de reins pour les deux lignées murines à 275 jours et 55 jours respectivement pour la lignée *Osgep* et *Lage3*, afin de voir si les mutations ont un impact sur la structure et l'organisation globale des tissus d'intérêt.

En ce qui concerne l'histologie rénale, nous avons réalisé trois colorations différentes afin d'avoir une vision globale de la morphologie des tissus (coloration H&E pour le noyau et le cytoplasme), la présence de tissus conjonctifs (coloration à l'acide périodique Schiff, PAS) mettant en évidence les mucines des épithéliums à bordure en brosse, les membranes basales) et la présence de fibrose (coloration trichrome de Masson pour les collagènes). Cependant, aucune différence morphologique n'a été observée, que ce soit au niveau des tubules rénaux ou des glomérules, lorsque nous avons comparé les différentes coupes de rein des souris WT (n=5) avec celles des souris *Osgep* Ki hom et *Lage3* Ki hémi (n=5) (**Figure 56** et **Figure 57**).



Figure n°56 : Coupes histologiques des reins des souris WT et Osgep Ki hom (n=5). Les coupes de 4 μm d'épaisseur ont été colorées à l'H&E, PAS et Trichrome de Masson.



Figure n°57 : Coupes histologiques de reins des souris WT et Lage3 Ki hémi (n=5). Les coupes de 4 μm d'épaisseur ont été colorées à l'H&E, PAS et Trichrome de Masson.

En ce qui concerne les coupes de cerveaux, nous avons étudié en particulier le cervelet car cette partie du cerveau a été décrite comme étant atrophiée chez les patients porteurs des variations protéiques OSGEP p.R325Q et LAGE3 p.F137S (Braun et al. 2017; Edvardson et al. 2017; Wang et al. 2018). Cependant, aucune différence n'a été observée lorsque nous avons comparé la taille du cervelet entre les souris WT (n=5) et les souris *Osgep* Ki hom et *Lage3* Ki hémi (n=5) (**Figure 58-gauche** et **Figure 59-gauche**). De plus, aucune anomalie n'a été observée dans l'organisation des différentes couches moléculaires (CM) et granulaires (CG), au niveau des cellules de Purkinje (CP) et de la substance blanche du cervelet (SMB) (**Figure 58-droite** et **Figure 59-droite**). D'autres parties du cerveau comme l'hippocampe et le cervelet, zones importantes dans le développement du cerveau, ont été étudiées mais aucune anomalie n'a été observée chez les animaux mutés (données non présentées). H&E 2.5x H&E 40x







Figure n°59 : Coupes histologiques du cerveau d'une souris WT et d'une souris Lage3 Ki hémi. Les coupes de 7 μm d'épaisseur ont été colorées par l'H&E. Les abréviations sont : CM, couche moléculaire ; CP, cellules de Purkinje; CG, couche granulaire.

(1) Etudes moléculaires

Le complexe KEOPS est un complexe finement régulé dans la cellule (Wan et al. 2016). Etant donné que nous avions montré que l'absence de la protéine GON7 entraînait une déstabilisation du complexe et affectait l'expression des 4 sous-unités du complexe, au niveau protéique, nous nous sommes demandé si les mutations des gènes *Lage3* et *Osgep* affectaient l'expression des autres sousunités du complexe. Pour cela, nous avons comparé l'expression des différents gènes du complexe KEOPS dans le cerveau et le rein entre les souris Ki et les souris WT par RT-qPCR et par immunoblot. Malheureusement, nous n'avons pu analyser les immunoblots car les anticorps donnaient beaucoup trop de bandes non spécifiques. Différents anticorps et conditions d'hybridation ont été testés sans succès.

Les analyses par RT-qPCR n'ont pas mis en évidence de différence d'expression des cinq sous-unités du complexe KEOPS entre les souris WT et les souris *Osgep* Ki hom et Lage3 Ki hémi dans le cerveau (**Figure 60** et **Figure 61**, respectivement). La même série d'expérience a été réalisée dans le rein, cependant aucune différence n'a été observée dans cet organe entre les souris WT et *Osgep* Ki hom et *Lage3* Ki hémi (**Figure 62** et **Figure 63**).

hom dans le cerveau par rapport aux souris WT

Expression de l'ARNm Osgep des souris Osgep Ki Expression de l'ARNm Lage3 des souris Osgep Ki hom dans le cerveau par rapport aux souris WT



Expression de l'ARNm TP53RK des souris Osgep Ki Expression de l'ARNm TPRKB des souris Osgep Ki hom dans le cerveau par rapport aux souris WT hom dans le cerveau par rapport aux souris WT





Expression de l'ARNm Gon7 des souris Osgep Ki hom dans le cerveau par rapport aux souris WT

Expression de l'ARNm YRDC des souris Osgep Ki hom dans le cerveau par rapport aux souris WT





Figure n°60 : Analyse de l'expression des gènes du complexe KEOPS dans le cerveau des souris WT (n=5) et des souris Osgep Ki hom (n=5).

Expression de l'ARNm Osgep des souris Osgep Ki hom dans le rein par rapport aux souris WT



dans le rein par rapport aux souris WT



dans le rein par rapport aux souris WT



Expression de l'ARNm Lage3 des souris Osgep Ki hom dans le rein par rapport aux souris WT



Expression de l'ARNm TP53RK des souris Osgep Ki hom Expression de l'ARNm TPRKB des souris Osgep Ki hom dans le rein par rapport aux souris WT



dans le rein par rapport aux souris WT



Figure n°61 : Analyse de l'expression des gènes du complexe KEOPS dans le rein des souris WT (n=5) et des souris Osgep Ki hom (n=4).

dans le cerveau par rapport aux souris WT



dans le cerveau par rapport aux souris WT



Expression de l'ARNm Gon7 des souris Lage3 Ki hémi dans le cerveau par rapport aux souris WT



Expression de l'ARNm Osgep des souris Lage3 Ki hémi Expression de l'ARNm Lage3 des souris Lage3 Ki hémi dans le cerveau par rapport aux souris WT



Expression de l'ARNm TP53RK des souris Lage3 Ki hémi Expression de l'ARNm TPRKB des souris Lage3 Ki hémi dans le cerveau par rapport aux souris WT



Expression de l'ARNm YRDC des souris Lage3 Ki hémi dans le cerveau par rapport aux souris WT



Figure n°62 : Analyse de l'expression des gènes du complexe KEOPS dans le cerveau des souris WT (n=5) et Lage3 KI hémi (n=5).







Expression de l'ARNm TP53RK des souris Lage3 Ki hémi Expression de l'ARNm TPRKB des souris Lage3 Ki hémi dans le rein par rapport aux souris WT dans le rein par rapport aux souris WT





Expression de l'ARNm Gon7 des souris Lage3 Ki hémi Expression de l'ARNm YRDC des souris Lage3 Ki hémi dans le rein par rapport aux souris WT

dans le rein par rapport aux souris WT



2.0 Normalisé par rapport aux souris WT ns 1.5 1.0 0.5 1.38e.341hemi 0.0 ų,

Figure n°63 : Analyse de l'expression des gènes du complexe KEOPS dans le rein des souris WT (n=5) et Lage3 KI hémi (n=5).

c) Etablissement d'un modèle murin Osgep KI/KO

(1) Génération de la lignée

Vu de l'absence d'un phénotype chez les souris *Osgep* Ki hom, nous avons décidé de générer une troisième lignée en utilisant le modèle murin *Osgep* KO (nommé OS4A) établi dans le laboratoire avant mon arrivée sur ce projet. Dans ce modèle KO généré par CRISPR/Cas9, il y a une délétion d'une paire de base (c.468delC) à l'état hétérozygote dans l'exon 4 du gène *Osgep* conduisant à l'apparition d'un codon stop prématuré. L'inactivation du gène *Osgep* à l'état homozygote dans ce modèle entraîne une létalité embryonnaire précoce. Nous avons émis l'hypothèse que la combinaison d'un allèle *Osgep* KO et d'un allèle *Osgep* KI (mutation R325Q), reproduisant une association observée chez un patient avec GAMOS (patient N3741 dans Braun et al., 2017), favoriserait le développement d'anomalies rénales et/ou cérébrales. Pour cela, nous avons accouplé une souris *Osgep* Ki hom avec une souris *Osgep* OS4A KO hétérozygote (**Figure 64**).



Figure n°64 : Schéma de croisement des souris Osgep KI hom et KO het de la lignée KI/KO.

Étant donné que l'un des géniteurs est homozygote pour le KI, alors tous les animaux issus de cet accouplement seront porteurs de l'allèle KI et il y aura 50 % de souris KI/KO (les souris d'intérêt) et 50 % de souris Ki/WT qui serviront de contrôles car elles ne développeront pas la maladie. De la même manière que précédemment, la délétion de la base C dans l'exon 4 conduit à la disparition du site de restriction BseDI (CCNNGG), nous permettant ainsi de génotyper les animaux par PCR et digestion enzymatique. Nous avons utilisé la PCR OS4A pour discriminer les animaux porteurs ou non de la délétion dans l'exon 4 d'*Osgep*.

Pour cette PCR ciblant l'exon 4 d'*Osgep*, après digestion enzymatique des produits de PCR, deux fragments de digestion sont obtenus pour les souris possédant un allèle WT (fragments à 302 pb et 241 pb) alors qu'un seul fragment de 543 pb est obtenu pour les animaux possédant un allèle KO sur l'exon 4 (**Figure 65**).



Figure n°65 : Exemple de génotypage de souris issues de l'accouplement de la lignée Osgep KI avec la lignée Osgep KO.

Après amplification, les produits PCR sont digérés par BseDI et migrés sur gel d'agarose. Mq, marqueur.

Nous avons validé le génotype des souris par séquençage Sanger (**Figure 66**). Pour cette lignée, nous avons obtenu 43 animaux au total dont 21 KI/WT (48,8 %) et 22 KI/KO (51,2 %) ce qui est en accord avec les proportions attendues (50 % de chaque génotype).





(2) Etude macroscopique

Une fois les animaux KI/KO obtenus, nous avons observé leur aspect morphologique au cours de leur développement à partir de la naissance. A 6 mois, les souris KI/KO ne présentent pas de différence morphologique au niveau de la taille, ni au niveau de leur aspect général par rapport aux souris KI/WT (**Figure 67**).



Figure n°67 : Aspect des souris Osgep KI/WT et KI/KO.

Nous avons suivi le développement de ces souris sur plusieurs mois afin de surveiller l'apparition d'anomalies, en particulier d'une microcéphalie. Pendant 4 mois, des souris KI/WT et KI/KO ont été pesées une fois tous les quinze jours. Durant la durée de cette expérience, nous avons observé une légère diminution de poids mais non significative entre les deux cohortes (**Figure 68-A**). En parallèle, nous avons suivi le taux de survie de ces animaux pendant 6 mois (162 jours) et nous n'avons enregistré aucun décès précoce des animaux KI/KO (**Figure 68-B**).





Afin de tester si les souris KI/KO développent une protéinurie, nous avons fait migrer les urines sur gel SDS-PAGE puis coloré le gel au bleu de Coomassie. Nous n'avons pas observé de protéines dans les urines (aucune bande à la taille attendue de 60 kDa) à la fois pour les souris KI/WT et les souris KI/KO, indiquant une absence de protéinurie (**Figure 69**).



Figure n°69 : Urines issues des souris Osgep KI/WT (n=2) et KI/KO (n=3) à 164 jours postnatal migrées sur un gel SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie.

(3) Etudes histologiques

Afin de vérifier l'intégrité des tissus d'intérêt, nous avons réalisé des coupes histologiques de cerveau et de rein. Lors de l'étude des coupes de rein pour les souris KI/KO, aucune différence au niveau histologique n'a été observée entre les souris KI/WT et les souris KI/KO (**Figure 70**).



Figure n°70 : Coupes histologiques de reins des souris Osgep KI/WT et KI/KO. Coupes de 4 µm d'épaisseur colorées à l'H&E, PAS et Trichrome de Masson (155 jours).

Aucune différence n'a été observée lorsque nous avons comparé la taille du cervelet entre les souris KI/WT et les souris KI/KO (**Figure 71-gauche**). De plus, nous n'avons remarqué aucune différence dans l'organisation des différentes couches moléculaire (CM), granulaire (CG), des cellules de Purkinje (CP) et de la substance blanche du cervelet (SMB) entre les souris KI/KO et les souris KI/WT (**Figure 71-droite**). D'autres parties du cerveau comme l'hippocampe et le cortex, zones importantes dans le développement du cerveau ont été étudiées, cependant aucune différence n'a pu être mise en évidence entre les souris KI/KO et les souris KI/KO et les souris KI/KO et les souris en férience n'a pu être mise en évidence entre les souris KI/KO et les souris KI/WT (données non présentées).



Figure n°71 : Coupes histologiques du cervelet des souris Osgep KI/WT et KI/KO (155 jours). Les coupes de 7 μm d'épaisseur ont été colorées par l'H&E. Les abréviations sont : CM, couche moléculaire ; CP, cellules de Purkinje; CG, couche granulaire.

3. <u>Inactivation des gènes du complexe KEOPS par électroporation</u> <u>in utero</u>

Les patients atteints du GAMOS ont une microcéphalie primaire indiquant que le développement du cerveau est altéré à un stade très précoce. Comme les différentes lignées de souris mutées pour les gènes du complexe KEOPS que nous avons générées au laboratoire ne présentent pas le phénotype attendu, nous avons donc décidé d'utiliser une autre approche qui permet d'inactiver un gène du complexe KEOPS de façon spécifique par interférence de l'ARN à un stade embryonnaire précoce : l'électroporation in utero (en collaboration avec le laboratoire de « Génétique et Développement du Cortex Cérébral », dirigé par le Dr Pierani à l'Institut Imagine). Cette technique consiste à appliquer un champ électrique bref grâce à deux électrodes placées de part et d'autre de la zone que l'on souhaite électroporer (par exemple le cerveau). Lors du choc électrique, les parois cellulaires sont perméabilisées et l'ADN est transféré dans les cellules. Nous avons ainsi voulu étudier l'impact de l'absence des 3 gènes Osgep, Lage3 et Gon7 au cours du développement cérébral, en particulier au cours de la neurogénèse en étudiant plus précisément l'apoptose, la prolifération et la migration des neurones au stade embryonnaire E16. Ces expériences nous permettront de pallier la mortalité précoce des animaux Osgep KO. De plus, nous pourrons identifier les défauts d'organisation du cerveau au niveau macroscopique et microscopique afin d'estimer la quantité et la qualité des différents types cellulaires dans les différentes régions du cerveau (cervelet, cortex cérébral) à différents stades de développement, et d'identifier des altérations spécifiques des gènes régulés par le complexe KEOPS. Ces expériences pourront nous aider dans la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans le développement de l'atteinte neurologique observé dans le GAMOS. Cette approche a déjà été utilisée par l'équipe du Dr Pierani notamment dans l'identification d'un nouveau domaine de la protéine Dbx1 qui est indispensable pour le développement des cellules nerveuses (Karaz et al., 2016).

a) Conception des shARN et clonage

Pour chaque gène, nous avons choisi un shARN. Les séquences du shARN sont composées de deux sites de restriction BamHI et Xhol de part et d'autre de leurs extrémités afin de faciliter le clonage dans le vecteur plasmidique pSuper (Oligoengine, VEC-PBS-0001/0002). La séquence du shARN est présente en sens et anti-sens, ce qui va permettre le repliement du sh en une structure en épingle à cheveux. Pour que les deux séquences puissent s'apparier correctement, elles sont séparées par une boucle de 9 nucléotides. La séquence terminatrice permet le recrutement des protéines qui permettront l'activation des mécanismes de l'ARN interférence, une fois le shARN à l'intérieur de la cellule (**Figure 72**).



Figure n°72 : Schéma et séquences des shARN contre les gènes Osgep, Lage3 et Gon7.

b) Vérification de l'efficacité des shARN in vitro avant l'électroporation

Afin de vérifier l'efficacité des shARN choisis, nous avons co-transfecté des cellules murines du canal collecteur médullaire interne ou IMCD (« inner medullary collecting duct ») avec le vecteur pSuper contenant le shARN et un plasmide exprimant la GFP (pCAG-GFP, don de l'équipe Pierani). Après un tri des cellules GFP positives, nous avons observé une réduction de 50 % des transcrits *Osgep*, *Lage3* et *Gon7* dans les cellules co-transfectées avec le vecteur contenant le shARN et la GFP par rapport aux cellules transfectées uniquement avec la GFP (**Figure 73**).



Figure n°73 : Validation de l'efficacité des shARN.

Les cellules IMCD ont été transfectées soit avec les plasmides pSuper contenant shARN et pCAG-GFP, soit avec le plasmide pCAG-GFP seul. Le contrôle NT correspond aux IMCD non transfectées. Les cellules GFP+ sont triées et leur ARN extraits pour réaliser une RT-qPCR.

Les gènes du complexe KEOPS étant des gènes essentiels très conservés dans les domaines du vivant, il est difficile d'obtenir une réduction importante du niveau d'expression de leurs transcrits. Cependant, ce résultat nous a permis de valider l'efficacité des shARN que nous avons choisis pour chacun des gènes ciblés. Nous allons pouvoir utiliser ces shARN pour réaliser les électroporations *in utero*. Une fois les électroporations effectuées, les embryons de souris seront sacrifiés à E16 afin de réaliser des coupes histologiques du cerveau. Ces expériences avaient été programmées pour fin avril, cependant à cause du confinement national lié à la pandémie du virus SARS-CoV-2, il ne sera pas possible de les réaliser avant la soutenance de mon mémoire, les conditions de la remise en route des laboratoires de l'Institut Imagine n'étant pas encore précisément définies.

E. <u>Discussion – perspectives</u>

1. <u>Etude in vitro de la stabilité du complexe KEOPS</u>

Mon laboratoire d'accueil a récemment identifié des mutations dans des gènes codant des protéines impliquées dans la voie de biosynthèse de t⁶A, une modification qui se produit sur un nombre restreint d'ARNt et qui est cruciale pour une traduction précise et efficace des protéines. Les enfants porteurs de mutations dans ces gènes présentent un syndrome de Galloway-Mowat (GAMOS), une maladie génétique rare associant une atteinte rénale à une microcéphalie et des anomalies neurologiques. Ce syndrome pose la question fascinante des voies moléculaires qui pourraient être communes au cerveau et aux reins. De plus, les différents processus cellulaires altérés dans les modèles cellulaires de GAMOS générés par mon laboratoire, soulignent le rôle crucial de cette modification dans la pathogenèse de GAMOS. Cependant, à l'exception de la sous-unité OSGEP, la

fonction précise des autres sous-unités du complexe KEOPS n'est pas encore connue, en particulier celle de la protéine GON7 récemment identifiée comme étant la 5^{ème} sous-unité du complexe.

Les études menées au laboratoire ont permis de montrer que les protéines LAGE3 et GON7 interagissent et que cette interaction pourrait moduler la stabilité et donc la fonction du complexe KEOPS. Je me suis donc intéressée à l'étude de la stabilité du complexe KEOPS en commençant par étudier les protéines LAGE3 et GON7. Les résultats obtenus montrent que lorsque les deux protéines sont co-exprimées, elles sont plus stables et donc dégradées moins rapidement. En revanche, lorsqu'elles sont exprimées séparément, elles sont plus rapidement dégradées. Cela est vrai surtout pour la protéine GON7 dont la stabilité semble dépendre particulièrement de la présence de LAGE3. Cette étude permet de valider l'hypothèse d'une stabilisation des deux protéines GON7 et LAGE3 lorsque celles-ci sont co-exprimées dans des cellules humaines rénales (HEK293T). Nos résultats sont renforcés par ceux obtenus par nos collaborateurs : le Pr van Tilbeurgh (Directeur du laboratoire de biologie structurale « Fonction et architecture des assemblages macromoléculaires » à l'Institut de Biologie Intégrative de la Cellule à Orsay) et son équipe, qui ont montré que GON7 est une protéine intrinsèquement désordonnée qui devient partiellement structurée suite à son interaction avec LAGE3 (Arrondel et al., 2019). Ces résultats sont dans la continuité de leurs études chez la levure démontrant que la liaison de Gon7 (orthologue de GON7) à Pcc1 (orthologue de LAGE3) empêche la dimérisation du complexe KEOPS car Gon7 se fixe sur les sites de dimérisation de Pcc1 (Zhang et al., 2015). D'autre part, une autre équipe a montré que la quantité de t⁶A produite par le complexe KEOPS est 5 fois plus importante quand la protéine GON7 est présente (Wan et al., 2017). Cela suggère une forte implication de GON7 dans la régulation du complexe KEOPS via son interaction avec LAGE3. Pour aller plus loin dans l'étude des interactions entre les différents membres du complexe KEOPS et la stabilité de ce dernier, il serait intéressant d'étendre les expériences de demi-vie aux autres protéines du complexe KEOPS (OSGEP, TP53RK et TPRKB) afin d'étudier si le même phénomène est observé pour les autres membres du complexe KEOPS. D'autre part, le laboratoire a établi des lignées de cellules pluripotentes induites (iPSCs) à partir des cellules de patients avec GAMOS (2 patients mutés pour le gène GON7 et 1 patient muté pour le gène OSGEP) qui pourront être différenciées en podocytes, progéniteurs neuronaux et en organoïdes rénaux et cérébraux. Ces nouveaux modèles sont complémentaires à ceux déjà développés et ouvrent de nouvelles voies pour identifier de nouveaux mécanismes physiopathologiques conduisant au GAMOS.

2. Etude in vivo du complexe KEOPS chez la souris

Depuis plusieurs années, le laboratoire utilise les modèles murins pour modéliser les syndromes néphrotiques héréditaires, en particulier le SNCR lié à des mutations du gène NPHS2. Avant mon arrivée au laboratoire, deux lignées KO avaient été générées pour tenter de modéliser le GAMOS. Le premier modèle généré a été un KO du gène GON7 car les patients mutés pour ce gène ont tous un stop prématuré dans le premier exon du gène (c.21C>A, p.Y7X) qui aboutit à une absence totale de la protéine GON7. Cependant, ces souris homozygotes pour le KO ne présentent aucun phénotype particulier (pas de microcéphalie, ni de protéinurie à 18 mois), malgré l'ensemble des études biochimiques, histologiques et moléculaires réalisées (résultats non publiés dans la littérature scientifique). Le second modèle a été généré après l'identification des premières mutations dans le gène OSGEP chez des patients avec un GAMOS. Ce modèle murin généré par la technologie du CRISPR/Cas9 est caractérisé par la délétion d'une base (c.468delC) aboutissant à l'apparition d'un codon stop prématuré à l'acide aminé 167 (la protéine Osgep contenant 335 acides aminés) (résultats non publiés dans la littérature scientifique). A l'inverse du KO de Gon7, nous n'avons obtenu aucun animal homozygote pour le KO du gène Osgep indiquant que l'absence de protéine Osgep fonctionnelle est létale à un stade embryonnaire précoce. Ces résultats sont en accord avec le fait que le gène OSGEP est extrêmement conservé au cours de l'évolution et qu'il fait partie des gènes dits « essentiels » (Hart et al., 2015). En effet, nous avons montré que l'inactivation du gène OSGEP par interférence par ARN dans une lignée de podocytes humains conduit à une diminution de la survie cellulaire caractérisée par une diminution de la prolifération, une augmentation de l'apoptose ainsi qu'une diminution de la synthèse protéique et du niveau de t⁶A (Braun et al., 2017).

Afin de comprendre les anomalies du développement rénal et cérébral au cours de la pathologie chez les patients atteints du GAMOS, mon objectif a donc été de générer grâce à la technique du CRISPR/Cas9 deux modèles murins porteurs des variations protéiques Osgep p.R325Q et Lage3 p.F137S, mutations identifiées chez des patients avec GAMOS. Des études cliniques (aspect macroscopique, analyses biochimiques des urines), histologiques (coupes de reins et de cerveau) et moléculaires (RT-qPCR) ont été réalisées sur les animaux *Osgep* KI homozygotes et *Lage3* KI hémizygotes. Cependant, aucune anomalie n'a été détectée et aucun animal ne présente de protéinurie, ni de microcéphalie. Le seul phénotype observé sur les souris *Lage3* KI hémizygotes est un retard pondéral important par rapport aux souris contrôles, ainsi qu'une mort prématurée dont l'origine n'a pas encore été identifiée. Cette anomalie pourrait être due à un problème de développement, de nutrition ou de métabolisme car le retard pondéral observé débute au moment du sevrage des souriceaux (vers 21 jours). Nous ne pouvons pas non plus écarter que ce phénotype

soit dû à des mutations « off-targets » qui peuvent survenir lors de l'utilisation de la technique du CRISPR/Cas9. Ces « off-targets » sont le résultat de coupures du génome par la Cas9 à des loci non souhaités, c'est-à-dire en dehors de la région ciblée par le guide. Les « off-targets » prédits par le logiciel CRISPOR-tefor, utilisé pour choisir les guides devront être testés afin d'exclure cette hypothèse ; même si une recherche bio-informatique et bibliographique a permis de déterminer qu'aucun « off-target » prédit ne touche un gène impliqué dans le développement.

Des expériences de complémentation fonctionnelle basée sur la croissance cellulaire ont été réalisées dans des levures délétées pour le gène Kae1, orthologue du gène humain OSGEP. Ces expériences ont permis d'identifier deux classes fonctionnelles d'allèles mutants : (i) les allèles hypomorphes qui ont rétabli la croissance mais de façon moins efficace que l'allèle OSGEP sauvage (WT), et ii) des allèles amorphes qui étaient totalement incapables de restaurer la croissance des levures délétées pour Kae1 (Braun et al., 2017). Or, la mutation p.R325Q a été montrée comme étant un allèle hypomorphe. Il est donc possible que l'absence de phénotype chez les souris Osgep KI homozygotes pour la mutation p.R325Q, soit due au fait que l'allèle R325Q hypomorphe conduit à une protéine moins active que la protéine Osgep sauvage, mais que cette activité amoindrie n'est pas suffisante pour engendrer des anomalies au niveau du rein et du cerveau. De façon intéressante, cette mutation à l'état homozygote chez des patients n'entraine pas l'apparition d'un SN mais plutôt d'une tubulopathie, une atteinte rénale moins sévère. Cependant, les patients présentent bien une microcéphalie (Braun et al., 2017). Pour tenter de déclencher l'apparition d'un phénotype (rénal et/ou cérébral), nous avons décidé de croiser les souris Osgep KI homozygotes avec les souris Osgep KO hétérozygotes (souris KI/KO). En effet, la combinaison d'un allèle OSGEP KO (mutation d'épissage entrainant l'apparition d'un codon stop prématuré sur la protéine) avec l'allèle portant la variation protéique OSGEP p.R325Q a déjà été retrouvée chez des patients GAMOS qui présentaient un phénotype plus sévère avec un SN congénital et une microcéphalie (Braun et al., 2017). Cependant, malgré l'ensemble des études réalisées, les souris Osgep KI/KO ne présentent pas de phénotype tout comme les souris Osgep KI homozygotes et Lage3 KI hémizygotes.

Les modèles murins portant des mutations faux-sens de gènes impliqués dans des pathologies humaines ne présentant aucun phénotype ne sont pas rares et c'est le cas par exemple, pour *INF2* (INverted Formin 2) un gène codant pour une protéine accélérant la polymérisation ou dépolymérisation des filaments d'actine. Le modèle murin créé en 2016 et porteur de la variation protéique INF2 p.R218Q ne présente pas de phénotype clair à l'état hétérozygote ou homozygote à 15 semaines (4 mois) (Subramanian et al., 2016). Chez l'homme, un grand nombre des SNCR AD (16 %) a été associé à des mutations dans ce gène dont l'atteinte rénale se traduit par une hyalinose ségmentaire et focale (HSF) (Barua et al., 2013). En conclusion, ces résultats montrent la difficulté de

mettre au point un modèle murin pour le GAMOS à la fois viable et présentant un phénotype proche de celui des patients. L'ensemble de ces résultats semble indiquer que l'insertion de mutations humaines chez la souris ne semble pas donner de phénotype proche de celui des patients malgré une forte conservation génétique entre l'homme et la souris.

Récemment, le groupe de F. Hildebrandt (Boston, Etats-Unis), avec lequel notre équipe a collaboré pour l'étude du complexe KEOPS, a réalisé le KO de chacun des quatre gènes KEOPS (Osgep, Lage3, TP53RK, TPRKB) chez la souris par CRISPR/Cas9 (Braun et al., 2017). Ils ont sacrifié les embryons CRISPR FO au stade embryonnaire 18,5 (E18,5) pour effectuer des mesures du cerveau et ont montré une réduction de la longueur et de la largeur du cortex reproduisant le phénotype de la microcéphalie observée chez l'homme. Cependant, les embryons obtenus présentaient un taux de mosaïcisme important, avec des populations de cellules portant des mutations différentes dans le gène Osgep. Ils pouvaient être considérés comme hypomorphes, expliquant ainsi l'absence de mortalité embryonnaire de ces animaux, contrairement à notre modèle murin Osgep KO dont toutes les cellules étaient KO pour le gène. Cependant, il n'existe aucune donnée sur la survie de ces souris car aucune génération F1 puis lignée n'a été générée. Les embryons CRISPR-KO pour ces 4 gènes ne présentaient aucune anomalie rénale, ce qui pourrait s'expliquer par une mortalité précoce qui masquerait le développement de lésions rénales qui seraient apparues plus tard chez les animaux plus âgés (Braun et al., 2017). Il semble donc que la mortalité précoce des animaux délétés pour les gènes essentiels du complexe KEOPS soit un véritable frein à la reproduction du phénotype chez l'animal et donc à l'étude du développement du GAMOS. Afin de pallier cette mortalité très précoce, il serait intéressant de réaliser un modèle KO conditionnel avec le système Cre/LoxP qui permet de déléter un gène, par exemple Osgep, dans un tissu spécifique. Pour cela, il faut générer une lignée de souris où le gène d'intérêt est encadré de part et d'autre par des sites loxP (appelé gène floxé) ainsi qu'une lignée transgénique porteuse du transgène Cre sous le contrôle d'un promoteur permettant l'expression spécifique de la Cre recombinase dans un tissu donné (rein, cerveau) ou un type cellulaire donné (podocytes, progéniteurs neuronaux). Le croisement entre ces deux lignées permet d'obtenir des animaux qui porteront la délétion du gène d'intérêt dans le tissu donné (Sauer, 1998). Cette stratégie permet non seulement de contourner le problème de la létalité embryonnaire qui se produit lorsque toutes les cellules de l'embryon portent la mutation, mais encore d'examiner l'effet de cette mutation dans n'importe quel tissu/cellule. La génération de ces lignées transgéniques Flox et Cre étant tout de même compliquée et longue, nous nous sommes tournés vers une autre approche, celle de l'électroporation in utero. Cette technique, réalisée en collaboration avec l'équipe du Dr Pierani, permet d'inactiver un gène par interférence à l'ARN en électroporant un shARN dans les cerveaux d'embryons de souris à un stade embryonnaire précoce (E13.5), ce qui permet d'étudier l'impact de l'inactivation de ce gène sur le développement du cerveau (Karaz et al., 2016).

En conclusion, au cours de ce travail, j'ai réalisé des études *in vitro* et *in vivo* pour mieux comprendre la physiopathologie du GAMOS. L'approche *in vitro* nous a permis de montrer que la stabilité de la protéine GON7 est augmentée par son interaction avec LAGE3 et que GON7 modulerait la stabilité et, par conséquent, la fonction du complexe KEOPS. Cependant, l'approche *in vivo* qui consistait à générer différents modèles murins n'a pas permis de reproduire le phénotype observé chez les patients atteints du GAMOS. De nombreuses études restent à faire, cependant, les différentes perspectives évoquées au cours de cette discussion et notamment l'approche novatrice d'électroporation *in utero* nous permettront peut-être d'obtenir un modèle animal reproduisant le phénotype du GAMOS observé chez l'homme.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Ma participation aux projets de recherche du Laboratoire des Maladies Rénales Héréditaires pendant mes trois années de formation au diplôme de l'EPHE m'ont permis d'aborder deux problématiques différentes utilisant des approches complémentaires.

Lors de nos études fonctionnelles chez la drosophile portant sur deux gènes candidats de syndrome néphrotique, *ADD3* et *KAT2B*, nous avons mis en évidence que les mutations dans ces deux gènes sont requises pour l'apparition du phénotype rénal précoce, résultat en faveur d'une action synergique entre les deux gènes. Ce résultat a permis de valider pour la première fois l'implication des gènes *ADD3* et *KAT2B* dans les syndromes néphrotiques. De nombreuses autres investigations restent à mettre en œuvre, notamment la validation de ces résultats en identifiant d'autres patients présentant les mêmes mutations et symptômes. Lorsque la question de synergie a été soulevée dans ce projet, il a été pertinent d'utiliser un modèle animal possédant une grande souplesse afin d'étudier l'expression de différents gènes de manière ubiquitaire et/ou ciblée dans un organe. La drosophile était alors le modèle adéquat pour cette étude grâce à son cycle de vie rapide et l'utilisation du système UAS-Gal4.

Ce mémoire présente également les résultats de l'étude menée sur le syndrome de Galloway-Mowat. Ce travail porte sur l'analyse des différents membres du complexe KEOPS à la fois *in vitro* et *in vivo* et a pu mettre en évidence une stabilisation des protéines LAGE3 et GON7 dans les HEK293T. Dans ce cas, il a été est pertinent d'utiliser un modèle plus proche de l'homme comme la souris ou des cellules humaines. Malgré l'absence de phénotype des trois modèles murins présentés dans cette étude, la souris reste un modèle de choix par sa similitude génétique, physiologique et pathologique avec l'homme pour des études plus axées sur le développement de cette pathologie.

Ce travail ouvre donc un champ d'investigations passionnant sur la compréhension des gènes impliqués dans les syndromes néphrotiques à travers deux modèles animaux et notamment de la pertinence du choix du modèle animal à utiliser en fonction de la question scientifique posée.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Akilesh, S., Suleiman, H., Yu, H., Stander, M.C., Lavin, P., Gbadegesin, R., Antignac, C., Pollak, M., Kopp, J.B., Winn, M.P., et al. (2011). Arhgap24 inactivates Rac1 in mouse podocytes, and a mutant form is associated with familial focal segmental glomerulosclerosis. J Clin Invest *121*, 4127–4137.

Arrondel, C., Missoury, S., Snoek, R., Patat, J., Menara, G., Collinet, B., Liger, D., Durand, D., Gribouval, O., Boyer, O., et al. (2019). Defects in t6A tRNA modification due to GON7 and YRDC mutations lead to Galloway-Mowat syndrome. Nat Commun *10*, 3967.

Badenas, C., Praga, M., Tazón, B., Heidet, L., Arrondel, C., Armengol, A., Andrés, A., Morales, E., Camacho, J.A., Lens, X., et al. (2002). Mutations in theCOL4A4 and COL4A3 Genes Cause Familial Benign Hematuria. JASN *13*, 1248–1254.

Bao, Y.-W., Yuan, Y., Chen, J.-H., and Lin, W.-Q. (2018). Kidney disease models: tools to identify mechanisms and potential therapeutic targets. Zool Res *39*, 72–86.

Barisoni, L., Schnaper, H.W., and Kopp, J.B. (2007). A Proposed Taxonomy for the Podocytopathies: A Reassessment of the Primary Nephrotic Diseases. CJASN *2*, 529–542.

Barker, D., Hostikka, S., Zhou, J., Chow, L., Oliphant, A., Gerken, S., Gregory, M., Skolnick, M., Atkin, C., and Tryggvason, K. (1990). Identification of mutations in the COL4A5 collagen gene in Alport syndrome. Science *248*, 1224–1227.

Barua, M., Brown, E.J., Charoonratana, V.T., Genovese, G., Sun, H., and Pollak, M.R. (2013). Mutations in the INF2 gene account for a significant proportion of familial but not sporadic focal and segmental glomerulosclerosis. Kidney International *83*, 316–322.

Barua, M., Stellacci, E., Stella, L., Weins, A., Genovese, G., Muto, V., Caputo, V., Toka, H.R., Charoonratana, V.T., Tartaglia, M., et al. (2014). Mutations in PAX2 Associate with Adult-Onset FSGS. J Am Soc Nephrol *25*, 1942–1953.

Ben-Omran, T., Fahiminiya, S., and Sorfazlian, N. (2015). Nonsense mutation in the WDR73 gene is associated with Galloway-Mowat syndrome | Journal of Medical Genetics.

Bierzynska, A., Soderquest, K., Dean, P., Colby, E., Rollason, R., Jones, C., Inward, C.D., McCarthy, H.J., Simpson, M.A., Lord, G.M., et al. (2017). MAGI2 Mutations Cause Congenital Nephrotic Syndrome. J Am Soc Nephrol *28*, 1614–1621.

Boerkoel, C.F., Takashima, H., John, J., Yan, J., Stankiewicz, P., Rosenbarker, L., André, J.-L., Bogdanovic, R., Burguet, A., Cockfield, S., et al. (2002). Mutant chromatin remodeling protein SMARCAL1 causes Schimke immuno-osseous dysplasia. Nat Genet *30*, 215–220.

Boerries, M., Grahammer, F., Eiselein, S., Buck, M., Meyer, C., Goedel, M., Bechtel, W., Zschiedrich, S., Pfeifer, D., Laloë, D., et al. (2013). Molecular fingerprinting of the podocyte reveals novel gene and protein regulatory networks. Kidney International *83*, 1052–1064.

Boute, N., Gribouval, O., Roselli, S., Benessy, F., Lee, H., Fuchshuber, A., Dahan, K., Gubler, M.-C., Niaudet, P., and Antignac, C. (2000). NPHS2, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome. Nat Genet *24*, 349–354.

Boyer, O. INF2 Mutations in Charcot–Marie–Tooth Disease with Glomerulopathy | NEJM.
Boyer, O., Nevo, F., Plaisier, E., Funalot, B., Gribouval, O., Benoit, G., Cong, E.H., Arrondel, C., Tête, M.-J., Montjean, R., et al. (2011). INF2 Mutations in Charcot–Marie–Tooth Disease with Glomerulopathy. New England Journal of Medicine *365*, 2377–2388.

Brand, A.H., and Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. 15.

Braun, D.A., Rao, J., Mollet, G., Schapiro, D., Daugeron, M.-C., Tan, W., Gribouval, O., Boyer, O., Revy, P., Jobst-Schwan, T., et al. (2017). Mutations in the evolutionarily highly conserved KEOPS complex genes cause nephrotic syndrome with microcephaly. Nat Genet *49*, 1529–1538.

Brown, E.J., Schlöndorff, J.S., Becker, D.J., Tsukaguchi, H., Tonna, S.J., Uscinski, A.L., Higgs, H.N., Henderson, J.M., and Pollak, M.R. (2010a). Mutations in the formin gene INF2 cause focal segmental glomerulosclerosis. Nat Genet *42*, 72–76.

Carré, C., Szymczak, D., Pidoux, J., and Antoniewski, C. (2005). The Histone H3 Acetylase dGcn5 Is a Key Player in Drosophila melanogaster Metamorphosis. Molecular and Cellular Biology *25*, 8228–8238.

Chen, B.B., Prasad, C., Kobrzynski, M., Campbell, C., and Filler, G. (2016). Seizures Related to Hypomagnesemia. Child Neurol Open *3*.

Chung, V.Y., and Turney, B.W. (2017). A Drosophila genetic model of nephrolithiasis: transcriptional changes in response to diet induced stone formation. BMC Urol *17*, 109.

Colin, E., Huynh Cong, E., Mollet, G., Guichet, A., Gribouval, O., Arrondel, C., Boyer, O., Daniel, L., Gubler, M.-C., Ekinci, Z., et al. (2014). Loss-of-Function Mutations in WDR73 Are Responsible for Microcephaly and Steroid-Resistant Nephrotic Syndrome: Galloway-Mowat Syndrome. Am J Hum Genet *95*, 637–648.

Costessi, A., Mahrour, N., Sharma, V., Stunnenberg, R., Stoel, M.A., Tijchon, E., Conaway, J.W., Conaway, R.C., and Stunnenberg, H.G. (2012). The Human EKC/KEOPS Complex Is Recruited to Cullin2 Ubiquitin Ligases by the Human Tumour Antigen PRAME. PLoS One *7*.

Denholm, B., and Skaer, H. (2009). Bringing together components of the fly renal system. Curr Opin Genet Dev 19, 526–532.

Dossier, C., Jamin, A., and Deschênes, G. (2017). Idiopathic Nephrotic Syndrome: The EBV Hypothesis - PubMed.

Downey, M., Houlsworth, R., Maringele, L., Rollie, A., Brehme, M., Galicia, S., Guillard, S., Partington, M., Zubko, M.K., Krogan, N.J., et al. (2006). A Genome-Wide Screen Identifies the Evolutionarily Conserved KEOPS Complex as a Telomere Regulator. Cell *124*, 1155–1168.

Dreyer, S.D., Zhou, G., Baldini, A., Winterpacht, A., Zabel, B., Cole, W., Johnson, R.L., and Lee, B. (1998). Mutations in LMX1B cause abnormal skeletal patterning and renal dysplasia in nail patella syndrome. Nat Genet *19*, 47–50.

Edvardson, S., Prunetti, L., Arraf, A., Haas, D., Bacusmo, J.M., Hu, J.F., Ta-Shma, A., Dedon, P.C., de Crécy-Lagard, V., and Elpeleg, O. (2017). tRNA N6-adenosine threonylcarbamoyltransferase defect due to KAE1/TCS3 (OSGEP) mutation manifest by neurodegeneration and renal tubulopathy. Eur J Hum Genet *25*, 545–551.

El Yacoubi, B., Hatin, I., Deutsch, C., Kahveci, T., Rousset, J.-P., Iwata-Reuyl, D., G Murzin, A., and de Crécy-Lagard, V. (2011). A role for the universal Kae1/Qri7/YgjD (COG0533) family in tRNA modification. EMBO J *30*, 882–893.

Esch, H.V., Groenen, P., Nesbit, M.A., Schuffenhauer, S., Lichtner, P., Vanderlinden, G., Harding, B., Beetz, R., Bilous, R.W., Holdaway, I., et al. (2000). GATA3 haplo-insufficiency causes human HDR syndrome. Nature *406*, 419–422.

Fournier, M., Orpinell, M., Grauffel, C., Scheer, E., Garnier, J.-M., Ye, T., Chavant, V., Joint, M., Esashi, F., Dejaegere, A., et al. (2016). KAT2A/KAT2B-targeted acetylome reveals a role for PLK4 acetylation in preventing centrosome amplification. Nat Commun *7*, 13227.

Fujita, A., Tsukaguchi, H., Koshimizu, E., Nakazato, H., Itoh, K., Kuraoka, S., Komohara, Y., Shiina, M., Nakamura, S., Kitajima, M., et al. (2018). Homozygous splicing mutation in NUP133 causes Galloway– Mowat syndrome. Annals of Neurology *84*, 814–828.

Galloway, W.H., and Mowat, A.P. (1968). Congenital microcephaly with hiatus hernia and nephrotic syndrome in two sibs. Journal of Medical Genetics *5*, 319–321.

Gamberi, C., Hipfner, D.R., Trudel, M., and Lubell, W.D. (2017). Bicaudal C mutation causes myc and TOR pathway up-regulation and polycystic kidney disease-like phenotypes in Drosophila. PLoS Genet *13*.

Garg, P. (2018). A Review of Podocyte Biology. AJN 47, 3–13.

Gargano, J., Martin, I., Bhandari, P., and Grotewiel, M. (2005). Rapid iterative negative geotaxis (RING): a new method for assessing age-related locomotor decline in. Experimental Gerontology *40*, 386–395.

Gbadegesin, R.A., Hall, G., Adeyemo, A., Hanke, N., Tossidou, I., Burchette, J., Wu, G., Homstad, A., Sparks, M.A., Gomez, J., et al. (2014). Mutations in the Gene That Encodes the F-Actin Binding Protein Anillin Cause FSGS. J Am Soc Nephrol *25*, 1991–2002.

Gee, H.Y., Ashraf, S., Wan, X., Vega-Warner, V., Esteve-Rudd, J., Lovric, S., Fang, H., Hurd, T.W., Sadowski, C.E., Allen, S.J., et al. (2014). Mutations in EMP2 Cause Childhood-Onset Nephrotic Syndrome. Am J Hum Genet *94*, 884–890.

Gee, H.Y., Zhang, F., Ashraf, S., Kohl, S., Sadowski, C.E., Vega-Warner, V., Zhou, W., Lovric, S., Fang, H., Nettleton, M., et al. (2015). KANK deficiency leads to podocyte dysfunction and nephrotic syndrome. J Clin Invest *125*, 2375–2384.

Gee, H.Y., Sadowski, C.E., Aggarwal, P.K., Porath, J.D., Yakulov, T.A., Schueler, M., Lovric, S., Ashraf, S., Braun, D.A., Halbritter, J., et al. (2016). FAT1 mutations cause a glomerulotubular nephropathy. Nat Commun *7*.

Golay, M., Douillard, A., Nagot, N., Fila, M., Ichay, L., Dalla Vale, F., Tenenbaum, J., and Morin, D. (2017). Syndrome néphrotique idiopathique corticodépendant de l'enfant : facteurs prédictifs de recours à un traitement immunosuppresseur. Archives de Pédiatrie *24*, 1096–1102.

Gupta, I.R., Baldwin, C., Auguste, D., Ha, K.C.H., El Andalousi, J., Fahiminiya, S., Bitzan, M., Bernard, C., Akbari, M.R., Narod, S.A., et al. (2013). ARHGDIA: a novel gene implicated in nephrotic syndrome. J Med Genet *50*, 330–338.

Hart, T., Chandrashekhar, M., Aregger, M., Steinhart, Z., Brown, K.R., MacLeod, G., Mis, M., Zimmermann, M., Fradet-Turcotte, A., Sun, S., et al. (2015). High-Resolution CRISPR Screens Reveal Fitness Genes and Genotype-Specific Cancer Liabilities. Cell *163*, 1515–1526.

Has, C., Spartà, G., Kiritsi, D., Weibel, L., Moeller, A., Vega-Warner, V., Waters, A., He, Y., Anikster, Y., Esser, P., et al. (2012). Integrin α 3 Mutations with Kidney, Lung, and Skin Disease. N Engl J Med *366*, 1508–1514.

Hecker, A., Lopreiato, R., Graille, M., Collinet, B., Forterre, P., Libri, D., and van Tilbeurgh, H. (2008). Structure of the archaeal Kae1/Bud32 fusion protein MJ1130: a model for the eukaryotic EKC/KEOPS subcomplex. EMBO J *27*, 2340–2351.

Heeringa, S.F., Chernin, G., Chaki, M., Zhou, W., Sloan, A.J., Ji, Z., Xie, L.X., Salviati, L., Hurd, T.W., Vega-Warner, V., et al. (2011). COQ6 mutations in human patients produce nephrotic syndrome with sensorineural deafness. J Clin Invest *121*, 2013–2024.

Helmstädter, M., and Simons, M. (2017). Using <Emphasis Type="Italic">Drosophila</Emphasis> nephrocytes in genetic kidney disease. Cell Tissue Res *369*, 119–126.

Helmstädter, M., Lüthy, K., Gödel, M., Simons, M., Ashish, Nihalani, D., Rensing, S.A., Fischbach, K.-F., and Huber, T.B. (2012). Functional Study of Mammalian Neph Proteins in Drosophila melanogaster. PLoS One 7.

Helmstädter, M., Huber, T.B., and Hermle, T. (2017). Using the Drosophila Nephrocyte to Model Podocyte Function and Disease. Front Pediatr *5*.

Henderson, J.M., al-Waheeb, S., Weins, A., Dandapani, S.V., and Pollak, M.R. (2008). Mice with altered α -actinin-4 expression have distinct morphologic patterns of glomerular disease. Kidney International *73*, 741–750.

Hermle, T., Braun, D.A., Helmstädter, M., Huber, T.B., and Hildebrandt, F. (2017). Modeling Monogenic Human Nephrotic Syndrome in the Drosophila Garland Cell Nephrocyte. J Am Soc Nephrol *28*, 1521–1533.

Hovatta, I., Zapala, M.A., Broide, R.S., Schadt, E.E., Libiger, O., Schork, N.J., Lockhart, D.J., and Barlow, C. (2007). DNA variation and brain region-specific expression profiles exhibit different relationships between inbred mouse strains: implications for eQTL mapping studies. Genome Biol *8*, R25.

Huynh Cong, E., Bizet, A.A., Boyer, O., Woerner, S., Gribouval, O., Filhol, E., Arrondel, C., Thomas, S., Silbermann, F., Canaud, G., et al. (2014). A Homozygous Missense Mutation in the Ciliary Gene TTC21B Causes Familial FSGS. J Am Soc Nephrol *25*, 2435–2443.

Ihalmo, P., Palmén, T., Ahola, H., Valtonen, E., and Holthöfer, H. (2003). Filtrin is a novel member of nephrin-like proteins. Biochemical and Biophysical Research Communications *300*, 364–370.

Javor, E.D., Moran, S.A., Young, J.R., Cochran, E.K., DePaoli, A.M., Oral, E.A., Turman, M.A., Blackett, P.R., Savage, D.B., O'Rahilly, S., et al. (2004). Proteinuric Nephropathy in Acquired and Congenital Generalized Lipodystrophy: Baseline Characteristics and Course during Recombinant Leptin Therapy. J Clin Endocrinol Metab *89*, 3199–3207.

Jeanpierre, C., Denamur, E., Henry, I., Cabanis, M.O., Luce, S., Cécille, A., Elion, J., Peuchmaur, M., Loirat, C., Niaudet, P., et al. (1998). Identification of constitutional WT1 mutations, in patients with

isolated diffuse mesangial sclerosis, and analysis of genotype/phenotype correlations by use of a computerized mutation database. Am J Hum Genet *62*, 824–833.

Jefferson, J.A., Lemmink, H.H., Hughes, A.E., Hill, C.M., Smeets, H.J., Doherty, C.C., and Maxwell, A.P. (1997). Autosomal dominant Alport syndrome linked to the type IV collage alpha 3 and alpha 4 genes (COL4A3 and COL4A4). Nephrol Dial Transplant *12*, 1595–1599.

Jiang, C., Gai, N., Zou, Y., Zheng, Y., Ma, R., Wei, X., Liang, D., and Wu, L. (2017). WDR73 missense mutation causes infantile onset intellectual disability and cerebellar hypoplasia in a consanguineous family. Clinica Chimica Acta *464*, 24–29.

Jinks, R.N., Puffenberger, E.G., Baple, E., Harding, B., Crino, P., Fogo, A.B., Wenger, O., Xin, B., Koehler, A.E., McGlincy, M.H., et al. (2015). Recessive nephrocerebellar syndrome on the Galloway-Mowat syndrome spectrum is caused by homozygous protein-truncating mutations of WDR73. Brain *138*, 2173–2190.

Kambham, N., Tanji, N., Seigle, R.L., Markowitz, G.S., Pulkkinen, L., Uitto, J., and D'Agati, V.D. (2000). Congenital focal segmental glomerulosclerosis associated with β 4 integrin mutation and epidermolysis bullosa. American Journal of Kidney Diseases *36*, 190–196.

Kaneko, K., Tsuji, S., Kimata, T., Kitao, T., Yamanouchi, S., and Kato, S. (2015). Pathogenesis of childhood idiopathic nephrotic syndrome: a paradigm shift from T-cells to podocytes. World J Pediatr *11*, 21–28.

Kaplan, J.M., H Kim, S., North, K.N., Rennke, H., A Correia, L., Tong, H.-Q., Mathis, B.J., Rodríguez-Pérez, J.-C., Allen, P.G., Beggs, A.H., et al. (2000). Mutations in ACTN4, encoding α -actinin-4, cause familial focal segmental glomerulosclerosis. Nat Genet *24*, 251–256.

Karamatic Crew, V., Burton, N., Kagan, A., Green, C.A., Levene, C., Flinter, F., Brady, R.L., Daniels, G., and Anstee, D.J. (2004). CD151, the first member of the tetraspanin (TM4) superfamily detected on erythrocytes, is essential for the correct assembly of human basement membranes in kidney and skin. Blood *104*, 2217–2223.

Karaz, S., Courgeon, M., Lepetit, H., Bruno, E., Pannone, R., Tarallo, A., Thouzé, F., Kerner, P., Vervoort, M., Causeret, F., et al. (2016). Neuronal fate specification by the Dbx1 transcription factor is linked to the evolutionary acquisition of a novel functional domain. EvoDevo 7.

Kawashi H (2020). New insight into podocyte slit diaphragm, a therapeutic target of proteinuria | SpringerLink.

Kestilä, M., Lenkkeri, U., Männikkö, M., Lamerdin, J., McCready, P., Putaala, H., Ruotsalainen, V., Morita, T., Nissinen, M., Herva, R., et al. (1998). Positionally Cloned Gene for a Novel Glomerular Protein—Nephrin—Is Mutated in Congenital Nephrotic Syndrome. Molecular Cell *1*, 575–582.

Kim, J.M., Wu, H., Green, G., Winkler, C.A., Kopp, J.B., Miner, J.H., Unanue, E.R., and Shaw, A.S. (2003). CD2-Associated Protein Haploinsufficiency Is Linked to Glomerular Disease Susceptibility. Science *300*, 1298–1300.

Kim, J.S., Bellew, C.A., Silverstein, D.M., Aviles, D.H., Boineau, F.G., and Vehaskari, V.M. (2005). High incidence of initial and late steroid resistance in childhood nephrotic syndrome. Kidney International *68*, 1275–1281.

Kos, C.H., Le, T.C., Sinha, S., Henderson, J.M., Kim, S.H., Sugimoto, H., Kalluri, R., Gerszten, R.E., and Pollak, M.R. (2003). Mice deficient in α -actinin-4 have severe glomerular disease. J Clin Invest *111*, 1683–1690.

Krall, P., Canales, C.P., Kairath, P., Carmona-Mora, P., Molina, J., Carpio, J.D., Ruiz, P., Mezzano, S.A., Li, J., Wei, C., et al. (2010). Podocyte-Specific Overexpression of Wild Type or Mutant Trpc6 in Mice Is Sufficient to Cause Glomerular Disease. PLoS ONE *5*, e12859.

Kruer, M.C., Jepperson, T., Dutta, S., Steiner, R.D., Cottenie, E., Sanford, L., Merkens, M., Russman, B.S., Blasco, P.A., Fan, G., et al. (2013). Mutations in Gamma Adducin are Associated With Inherited Cerebral Palsy. Ann Neurol *74*, 805–814.

Lemmers, R.J.L.F., Tawil, R., Petek, L.M., Balog, J., Block, G.J., Santen, G.W.E., Amell, A.M., van der Vliet, P.J., Almomani, R., Straasheijm, K.R., et al. (2012). Digenic inheritance of an SMCHD1 mutation and an FSHD-permissive D4Z4 allele causes facioscapulohumeral muscular dystrophy type 2. Nat Genet *44*, 1370–1374.

López, L.C., Schuelke, M., Quinzii, C.M., Kanki, T., Rodenburg, R.J.T., Naini, A., DiMauro, S., and Hirano, M. (2006). Leigh Syndrome with Nephropathy and CoQ10 Deficiency Due to decaprenyl diphosphate synthase subunit 2 (PDSS2) Mutations. Am J Hum Genet *79*, 1125–1129.

Machuca, E., Benoit, G., and Antignac, C. (2009). Genetics of nephrotic syndrome: connecting molecular genetics to podocyte physiology. Human Molecular Genetics *18*, R185–R194.

Mao, D.Y.L., Neculai, D., Downey, M., Orlicky, S., Haffani, Y.Z., Ceccarelli, D.F., Ho, J.S.L., Szilard, R.K., Zhang, W., Ho, C.S., et al. (2008). Atomic Structure of the KEOPS Complex: An Ancient Protein Kinase-Containing Molecular Machine. Molecular Cell *32*, 259–275.

Marelja, Z., and Simons, M. (2019). Filling the Gap: Drosophila Nephrocytes as Model System in Kidney Research. JASN *30*, 719–720.

Mariot, V., Roche, S., Hourdé, C., Portilho, D., Sacconi, S., Puppo, F., Duguez, S., Rameau, P., Caruso, N., Delezoide, A.-L., et al. (2015). Correlation between low FAT1 expression and early affected muscle in facioscapulohumeral muscular dystrophy. Annals of Neurology *78*, 387–400.

Matsuoka*, Y., Li, X., and Bennett, V. (2000). Adducin: structure, function and regulation. CMLS, Cell. Mol. Life Sci. *57*, 884–895.

Mele, C., latropoulos, P., Donadelli, R., Calabria, A., Maranta, R., Cassis, P., Buelli, S., Tomasoni, S., Piras, R., Krendel, M., et al. (2011). MYO1E MUTATIONS AND CHILDHOOD FAMILIAL FOCAL SEGMENTAL GLOMERULOSCLEROSIS. N Engl J Med *365*, 295–306.

Millet-Boureima, C., Porras Marroquin, J., and Gamberi, C. (2018). Modeling Renal Disease "On the Fly." Biomed Res Int *2018*.

Mollet, G., Ratelade, J., and Boyer, O. (2009). Podocin Inactivation in Mature Kidneys Causes Focal Segmental Glomerulosclerosis and Nephrotic Syndrome | American Society of Nephrology.

Ohler, S., Hakeda-Suzuki, S., and Suzuki, T. (2011). Hts, the Drosophila homologue of adducin, physically interacts with the transmembrane receptor golden goal to guide photoreceptor axons. Developmental Dynamics *240*, 135–148.

Okamoto, S., Amaishi, Y., Maki, I., Enoki, T., and Mineno, J. (2019). Highly efficient genome editing for single-base substitutions using optimized ssODNs with Cas9-RNPs. Sci Rep 9.

Perrochia, L., Crozat, E., Hecker, A., Zhang, W., Bareille, J., Collinet, B., van Tilbeurgh, H., Forterre, P., and Basta, T. (2013a). In vitro biosynthesis of a universal t6A tRNA modification in Archaea and Eukarya. Nucleic Acids Res *41*, 1953–1964.

Perrochia, L., Guetta, D., Hecker, A., Forterre, P., and Basta, T. (2013b). Functional assignment of KEOPS/EKC complex subunits in the biosynthesis of the universal t6A tRNA modification. Nucleic Acids Res *41*, 9484–9499.

Posey, J.E., Harel, T., Liu, P., Rosenfeld, J.A., James, R.A., Coban Akdemir, Z.H., Walkiewicz, M., Bi, W., Xiao, R., Ding, Y., et al. (2017). Resolution of Disease Phenotypes Resulting from Multilocus Genomic Variation. N Engl J Med *376*, 21–31.

Preston, R., Stuart, H.M., and Lennon, R. (2019). Genetic testing in steroid-resistant nephrotic syndrome: why, who, when and how? Pediatr Nephrol *34*, 195–210.

Puri, P.L., Sartorelli, V., Yang, X.-J., Hamamori, Y., Ogryzko, V.V., Howard, B.H., Kedes, L., Wang, J.Y.J., Graessmann, A., Nakatani, Y., et al. (1997). Differential Roles of p300 and PCAF Acetyltransferases in Muscle Differentiation. Molecular Cell *1*, 35–45.

Putaala, H., Soininen, R., Kilpeläinen, P., Wartiovaara, J., and Tryggvason, K. (2001). The murine nephrin gene is specifically expressed in kidney, brain and pancreas: inactivation of the gene leads to massive proteinuria and neonatal death. Hum Mol Genet *10*, 1–8.

Quinzii, C., Naini, A., Salviati, L., Trevisson, E., Navas, P., DiMauro, S., and Hirano, M. (2006). A Mutation in Para-Hydroxybenzoate-Polyprenyl Transferase (COQ2) Causes Primary Coenzyme Q10 Deficiency. Am J Hum Genet *78*, 345–349.

Ramos, J., and Fu, D. (2019). The emerging impact of tRNA modifications in the brain and nervous system. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms *1862*, 412–428.

Reiser, J., Pixley, F.J., Hug, A., Kriz, W., Smoyer, W.E., Stanley, E.R., and Mundel, P. (2000). Regulation of mouse podocyte process dynamics by protein tyrosine phosphatases. Kidney International *57*, 2035–2042.

Rodewald, R., and Karnovsky, M.J. (1974). POROUS SUBSTRUCTURE OF THE GLOMERULAR SLIT DIAPHRAGM IN THE RAT AND MOUSE. The Journal of Cell Biology *60*, 423–433.

Roselli, S., Heidet, L., Sich, M., Henger, A., Kretzler, M., Gubler, M.-C., and Antignac, C. (2004). Early Glomerular Filtration Defect and Severe Renal Disease in Podocin-Deficient Mice. Molecular and Cellular Biology *24*, 550–560.

Rosti, R.O., Sotak, B.N., Bielas, S.L., Bhat, G., Silhavy, J.L., Aslanger, A.D., Altunoglu, U., Bilge, I., Tasdemir, M., Yzaguirrem, A.D., et al. (2017). Homozygous mutation in *NUP107* leads to microcephaly with steroid-resistant nephrotic condition similar to Galloway-Mowat syndrome. Journal of Medical Genetics *54*, 399–403.

Sahr, K.E., Lambert, A.J., Ciciotte, S.L., Mohandas, N., and Peters, L.L. (2009). Targeted Deletion of the γ -Adducin Gene (Add3) in Mice Reveals Differences in α -Adducin Interactions in Erythroid and Nonerythroid Cells. Am J Hematol *84*, 354–361.

Sauer, B. (1998). Inducible Gene Targeting in Mice Using the Cre/loxSystem. Methods 14, 381–392.

Seiler, M., Venkatachalam, M., and Cotran, R. (1975). Glomerular epithelium: structural alterations induced by polycations. Science *189*, 390–393.

Shih, N.-Y., Li, J., Karpitskii, V., Nguyen, A., Dustin, M.L., Kanagawa, O., Miner, J.H., and Shaw, A.S. (1999). Congenital Nephrotic Syndrome in Mice Lacking CD2-Associated Protein. Science 286, 312–315.

Solanki, A.K., Widmeier, E., Arif, E., Sharma, S., Daga, A., Srivastava, P., Kwon, S.-H., Hugo, H., Nakayama, M., Mann, N., et al. (2019). Mutations in KIRREL1, a slit diaphragm component, cause steroid-resistant nephrotic syndrome. Kidney International *96*, 883–889.

Steiss, J.O., Gross, S., Neubauer, B.A., and Hahn, A. (2005). Late-onset nephrotic syndrome and severe cerebellar atrophy in Galloway-Mowat syndrome. Neuropediatrics *36*, 332–335.

Subramanian, B., Sun, H., Yan, P., Charoonratana, V.T., Higgs, H.N., Wang, F., Lai, K.-M.V., Valenzuela, D.M., Brown, E.J., Schlöndorff, J.S., et al. (2016). Mice with mutant Inf2 show impaired podocyte and slit diaphragm integrity in response to protamine-induced kidney injury. Kidney International *90*, 363–372.

Terzi, F., Burtin, M., and Friedlander, G. (2000). Using Transgenic Mice to Analyze the Mechanisms of Progression of Chronic Renal Failure. JASN *11*, S144–S148.

Ueda, Y., Gullipalli, D., and Song, W.-C. (2016). Modeling complement-driven diseases in transgenic mice: Values and limitations. Immunobiology *221*, 1080–1090.

Vodopiutz, J., Seidl, R., Prayer, D., Khan, M.I., Mayr, J.A., Streubel, B., Steiß, J.-O., Hahn, A., Csaicsich, D., Castro, C., et al. (2015). *WDR73* Mutations Cause Infantile Neurodegeneration and Variable Glomerular Kidney Disease. Human Mutation *36*, 1021–1028.

Wan, L.C.K., Pillon, M.C., Thevakumaran, N., Sun, Y., Chakrabartty, A., Guarné, A., Kurinov, I., Durocher, D., and Sicheri, F. (2016). Structural and functional characterization of KEOPS dimerization by Pcc1 and its role in t ⁶ A biosynthesis. Nucleic Acids Res *44*, 6971–6980..

Wan, L.C.K., Maisonneuve, P., Szilard, R.K., Lambert, J.-P., Ng, T.F., Manczyk, N., Huang, H., Laister, R., Caudy, A.A., Gingras, A.-C., et al. (2017c). Proteomic analysis of the human KEOPS complex identifies C14ORF142 as a core subunit homologous to yeast Gon7. Nucleic Acids Res *45*, 805–817.

Wang, H., Oestreich, E.A., Maekawa, N., Bullard, T.A., Vikstrom, K.L., Dirksen, R.T., Kelley, G.G., Blaxall, B.C., and Smrcka, A.V. (2005). Phospholipase C ε Modulates β-Adrenergic Receptor– Dependent Cardiac Contraction and Inhibits Cardiac Hypertrophy. Circulation Research *97*, 1305–1313.

Wang, P.Z.T., Prasad, C., Rodriguez Cuellar, C.I., and Filler, G. (2018). Nephrological and urological complications of homozygous c.974G>A (p.Arg325Gln) OSGEP mutations. Pediatric Nephrology *33*, 2201–2204.

Weavers, H., Prieto-Sánchez, S., Grawe, F., Garcia-López, A., Artero, R., Wilsch-Braeuninger, M., Ruiz-Gómez, M., Skaer, H., and Denholm, B. (2009). The insect nephrocyte is a podocyte-like cell with a filtration slit diaphragm. Nature *457*, 322–326.

Wharram, B.L., Goyal, M., Gillespie, P.J., Wiggins, J.E., Kershaw, D.B., Holzman, L.B., Dysko, R.C., Saunders, T.L., Samuelson, L.C., and Wiggins, R.C. (2000). Altered podocyte structure in GLEPP1 (Ptpro)-deficient mice associated with hypertension and low glomerular filtration rate.

Winn, M.P., Conlon, P.J., Lynn, K.L., Farrington, M.K., Creazzo, T., Hawkins, A.F., Daskalakis, N., Kwan, S.Y., Ebersviller, S., Burchette, J.L., et al. (2005). A Mutation in the TRPC6 Cation Channel Causes Familial Focal Segmental Glomerulosclerosis. *308*, 5.

Wu, Y., Liang, D., Wang, Y., Bai, M., Tang, W., Bao, S., Yan, Z., Li, D., and Li, J. (2013). Correction of a Genetic Disease in Mouse via Use of CRISPR-Cas9. Cell Stem Cell *13*, 659–662.

Xu, W., Edmondson, D.G., Evrard, Y.A., Wakamiya, M., Behringer, R.R., and Roth, S.Y. (2000). Loss of Gcn5l2 leads to increased apoptosis and mesodermal defects during mouse development. Nat Genet *26*, 229–232.

Yasukawa, T., Suzuki, T., Suzuki, T., Ueda, T., Ohta, S., and Watanabe, K. (2000). Modification Defect at Anticodon Wobble Nucleotide of Mitochondrial tRNAsLeu(UUR) with Pathogenic Mutations of Mitochondrial Myopathy, Encephalopathy, Lactic Acidosis, and Stroke-like Episodes. J. Biol. Chem. *275*, 4251–4257.

Yu, H., Artomov, M., Brähler, S., Stander, M.C., Shamsan, G., Sampson, M.G., White, J.M., Kretzler, M., Miner, J.H., Jain, S., et al. (2016). A role for genetic susceptibility in sporadic focal segmental glomerulosclerosis. J Clin Invest *126*, 1067–1078.

Zankl, A., Duncan, E.L., Leo, P.J., Clark, G.R., Glazov, E.A., Addor, M.-C., Herlin, T., Kim, C.A., Leheup, B.P., McGill, J., et al. (2012). Multicentric Carpotarsal Osteolysis Is Caused by Mutations Clustering in the Amino-Terminal Transcriptional Activation Domain of MAFB. Am J Hum Genet *90*, 494–501.

Zenker, M., Aigner, T., Wendler, O., Tralau, T., Müntefering, H., Fenski, R., Pitz, S., Schumacher, V., Royer-Pokora, B., Wühl, E., et al. (2004). Human laminin β 2 deficiency causes congenital nephrosis with mesangial sclerosis and distinct eye abnormalities. Hum Mol Genet *13*, 2625–2632.

Zhang, F., and Chen, X. (2014). The Drosophila nephrocyte has a glomerular filtration system. Nat Rev Nephrol *10*, 491–491.

Zhang, F., Zhao, Y., and Han, Z. (2013). An In Vivo Functional Analysis System for Renal Gene Discovery in Drosophila Pericardial Nephrocytes. J Am Soc Nephrol 24, 191–197.

Zhang, W., Collinet, B., Graille, M., Daugeron, M.-C., Lazar, N., Libri, D., Durand, D., and van Tilbeurgh, H. (2015). Crystal structures of the Gon7/Pcc1 and Bud32/Cgi121 complexes provide a model for the complete yeast KEOPS complex. Nucleic Acids Res *43*, 3358–3372.

Zhuang, S., Shao, H., Guo, F., Trimble, R., Pearce, E., and Abmayr, S.M. (2009). Sns and Kirre, the Drosophila orthologs of Nephrin and Neph1, direct adhesion, fusion and formation of a slit diaphragm-like structure in insect nephrocytes. Development *136*, 2335–2344.

ANNEXES



Citation: Gonçalves S, Patat J, Guida MC, Lachaussée N, Arrondel C, Helmstädter M, et al. (2018) A homozygous *KAT2B* variant modulates the clinical phenotype of *ADD3* deficiency in humans and flies. PLoS Genet 14(5): e1007386. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007386

Editor: Hugo J. Bellen, Baylor College of Medicine, UNITED STATES

Received: August 29, 2017

Accepted: April 30, 2018

Published: May 16, 2018

Copyright: © 2018 Gonçalves et al. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: The work has been supported by the ATIP-Avenir program, the Fondation Bettencourt-Schueller (Liliane Bettencourt Chair of Developmental Biology) as well as State funding by the Agence Nationale de la Recherche (ANR) under the "Investissements d'avenir" program (ANR-10-IAHU-01) and the NEPHROFLY (ANR-14-ACHN-0013) grant to MS. Financial support for this work RESEARCH ARTICLE

A homozygous *KAT2B* variant modulates the clinical phenotype of *ADD3* deficiency in humans and flies

Sara Gonçalves^{1,2,3°}, Julie Patat^{1,3°}, Maria Clara Guida⁴, Noelle Lachaussée^{1,3}, Christelle Arrondel^{1,3}, Martin Helmstädter⁵, Olivia Boyer^{1,3,6}, Olivier Gribouval^{1,3}, Marie-Claire Gubler^{1,3}, Geraldine Mollet^{1,3}, Marlène Rio⁷, Marina Charbit⁶, Christine Bole-Feysot³, Patrick Nitschke³, Tobias B. Huber^{5,8,9}, Patricia G. Wheeler¹⁰, Devon Haynes¹⁰, Jane Juusola¹¹, Thierry Billette de Villemeur^{12,13}, Caroline Nava^{14,15}, Alexandra Afenjar¹⁶, Boris Keren¹⁵, Rolf Bodmer⁴, Corinne Antignac^{1,3,7}*, Matias Simons^{2,3}*

1 Laboratory of Hereditary Kidney Diseases, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm) UMR1163, Imagine Institute, Paris, France, 2 Laboratory of Epithelial Biology and Disease, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm) UMR1163, Imagine Institute, Paris, France, 3 Université Paris Descartes—Sorbonne Paris Cité, Imagine Institute, Paris, France, 4 Development, Aging and Regeneration Program, Sanford-Burnham-Prebys Medical Discovery Institute, La Jolla, CA, United States of America, 5 Department of Medicine IV, Medical Center–University of Freiburg, Faculty of Medicine, University of Freiburg, Freiburg, Germany, 6 Department of Pediatric Nephrology, Centre de Référence des Maladies Rénales Héréditaires de l'Enfant et de l'Adulte (MARHEA), Hôpital Necker-Enfants Malades, Assistance Publique—Hôpitaux de Paris (AP-HP), Paris, France, 7 Department of Genetics, Hôpital Necker-Enfants Malades, AP-HP, Paris, France, 8 BIOSS Center for Biological Signalling Studies and Center for Systems Biology (ZBSA), Albert-Ludwigs-University, Freiburg, Germany, 9 III. Department of Medicine, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany, 10 Division of Genetics, Arnold Palmer Hospital for Children, Orlando Health, Orlando, FL, United States of America, 11 GeneDx, Inc, Gaithersburg, MD, United States of America, 12 Sorbonne Université, UPMC, GRC ConCer-LD and AP-HP, Hôpital Trousseau, Service de Neuropédiatrie—Pathologie du développement, Paris, France, 13 Centre de référence des déficits intellectuels de causes rares, Inserm U 1141, Paris, France, 14 Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, Inserm U1127, CNRS UMR 7225, Institut du Cerveau et de la Moèlle Épinière (ICM), Paris, France, 15 AP-HP, GH Pitié-Salpêtrière, Department of Genetics, Unit of Developmental Genomics, Paris, France. 16 AP-HP. Hôpital Trousseau. Centre de référence des malformations et maladies congénitales du cervelet, Département de génétique et embryologie médicale, Paris, France

These authors contributed equally to this work.
* corinne.antignac@inserm.fr (CA); matias.simons@institutimagine.org (MS)

Abstract

Recent evidence suggests that the presence of more than one pathogenic mutation in a single patient is more common than previously anticipated. One of the challenges hereby is to dissect the contribution of each gene mutation, for which animal models such as *Drosophila* can provide a valuable aid. Here, we identified three families with mutations in *ADD3*, encoding for adducin- γ , with intellectual disability, microcephaly, cataracts and skeletal defects. In one of the families with additional cardiomyopathy and steroid-resistant nephrotic syndrome (SRNS), we found a homozygous variant in *KAT2B*, encoding the lysine acetyltransferase 2B, with impact on KAT2B protein levels in patient fibroblasts, suggesting that this second mutation might contribute to the increased disease spectrum. In order to define the contribution of *ADD3* and *KAT2B* mutations for the patient phenotype, we performed functional experiments in the *Drosophila* model. We found that both mutations were unable to fully rescue the viability of the respective null mutants of the *Drosophila* homologs, *hts* and *Gcn5*,



was also provided by grants from the Agence Nationale de la Recherche (GenPod project ANR-12-BSV1-0033.01), the European Union's Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013/ grant n° 305608-EURenOmics), the "Investments for the Future" program (ANR-10-IAHY-01) and Fondation pour la recherche médicale (FRM Equipe 2015project DEQ20150331682) to CAn. SG was supported by the MD-PhD program of Imagine Institute (ANR-10-IAHU-01 and Fondation Bettencourt-Schueller). TBH was supported by the DFG (CRC1140, CRC 992, HU 1016/8-1), by the BMBF (01GM1518C), by the European Research Council-ERC grant 616891 and by the H2020-IMI2 consortium BEAt-DKD. RB was supported by NIH grants R01 HL54732, P01 AG033456, and RB&MCG by a Glenn Award for Research in Biological Mechanisms of Aging. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: Jane Juusola is an employee of GeneDx, Inc.

suggesting that they are indeed pathogenic in flies. While the *KAT2B/Gcn5* mutation additionally showed a significantly reduced ability to rescue morphological and functional defects of cardiomyocytes and nephrocytes (podocyte-like cells), this was not the case for the *ADD3* mutant rescue. Yet, the simultaneous knockdown of *KAT2B* and *ADD3* synergistically impaired kidney and heart function in flies as well as the adhesion and migration capacity of cultured human podocytes, indicating that mutations in both genes may be required for the full clinical manifestation. Altogether, our studies describe the expansion of the phenotypic spectrum in *ADD3* deficiency associated with a homozygous likely pathogenic *KAT2B* variant and thereby identify *KAT2B* as a susceptibility gene for kidney and heart disease in *ADD3*-associated disorders.

Author summary

Genetic diseases with complex syndromic constellations may be caused by mutations in more than one gene. Most examples studied so far describe genetic interactions of known disease genes, suggesting that a large number of multilocus diseases remain unexplored. Assessment of mutation pathogenicity can be achieved using animal models. One main advantage of using *Drosophila* is that it allows easy *in vivo* gene manipulation in cell types that are relevant for the disease. Here, we report the pathogenicity of *ADD3* mutations in three families with intellectual disability, microcephaly, cataracts and skeletal defects. Moreover, we provide evidence that the renal and cardiac phenotypes in one of the families could be unmasked by a homozygous variant in the lysine acetyltransferase encoding *KAT2B* gene. In *Drosophila*, this variant resulted not only in decreased viability, but also in functional defects in cardiomyocytes and nephrocytes, the latter being similar to mammalian podocytes. Our study implicates *KAT2B* as a susceptibility gene for steroid-resistant nephrotic syndrome (SRNS) and cardiomyopathy and emphasizes the importance of protein acetylation in kidney and heart function.

Introduction

The interrogation of the entire genome via next generation sequencing (NGS) technology has revolutionized clinical diagnostics. For medical genetics that traditionally focuses on finding monogenetic causes for Mendelian diseases, NGS has not only introduced much higher mutation detection rates but also unprecedented complexities. A recent retrospective analysis of more than 7000 exomes revealed multiple molecular diagnoses in around five percent of cases with suspected monogenic disease [1], suggesting that patients with multilocus diseases are underrecognized.

The phenotypic complexity of multilocus diseases, of which digenic disease represents the simplest and most common form, can be challenging for the physician, both when it comes to finding a diagnosis and to genetic counseling and risk assessment. Two distinct disease pheno-types in a single patient may present with a completely new clinical phenotype. On the other hand, two overlapping disease phenotypes may be misinterpreted as a single disease with increased severity. The underlying genetic defects are equally difficult to predict. Both compound phenotypes caused by mutations in two completely unrelated genes [1] and overlapping disease phenotypes caused by mutations in genes within the same pathway are possible [2–4].

But as genes can be pleiotropic, there are most likely many exceptions to this. Also, while two loci may be equal in importance [2], a second variant may simply enhance the general or organ-specific penetrance of a given mutation [4].

One important challenge is therefore to decompose the contributions of each gene mutation or variant to the clinical phenotypes in question. So far, most reports on digenic inheritance in Mendelian disease have focused on known disease genes [1, 5, 6]. However, the diagnosis is even more difficult when dealing with genes that have previously not been associated with any genetic diseases.

In this study, we identify three families with mutations in *ADD3*, encoding for adducin- γ , with intellectual disability, microcephaly, cataracts and skeletal defects, further supporting that *ADD3* is a disease gene as previously reported for a single family [7]. We further use mutation validation in *Drosophila* and mammalian cell culture to demonstrate that in one of the families additional phenotypes in kidney and heart are associated with a homozygous missense variant in the lysine acetyltransferase *KAT2B*.

Results

Clinical features of three families with intellectual disability and microcephaly

Six individuals in three families (families A-C) with intellectual disability and varying degrees of microcephaly (Table 1) were identified for this study. Individuals from family A and B also shared bilateral cataracts, corpus callosum defects as well as specific skeletal defects such as shortening of the third and fourth metatarsals (Fig 1A–1D and Table 1), while the affected boy from family C suffered from epilepsy, severe speech delay and suspected cerebral palsy (Table 1).

The affected sibs in the consanguineous family A additionally presented with steroid-resistant nephrotic syndrome (SRNS), a progressive renal disease characterized by podocyte lesions and massive proteinuria [8], and cardiomyopathy (Table 1). For individual II-1 and II-3, proteinuria was first detected at 7 and 12 years of age, respectively, and end-stage renal disease was diagnosed a decade later. Individual II-6 was diagnosed with SRNS and end-stage renal disease at the age of 13 years. In kidney biopsies, individuals II-3 and II-6 (Fig 1E) both showed focal segmental glomerulosclerosis (FSGS). In the biopsy of individual II-6, whose renal disease was at a more advanced stage, hypertrophic and vacuolated podocytes (Fig 1E) as well as tubular atrophy, interstitial fibrosis and inflammatory cell infiltrates could also be found. In addition, all affected individuals from family A developed dilated cardiomyopathy with progressive heart failure and arrhythmia (Table 1). Cardiac failure was the cause of death for both individuals II-1 and II-3.

Whole-exome sequencing identifies missense mutations in *ADD3* in all families

For the affected individuals in family A and C, the presence of mitochondrial disease was excluded by muscle biopsy. Moreover, high-resolution karyotypes were normal for all patients, and CGH arrays (performed for family B and C) did not show significant abnormalities. Consequently, whole exome sequencing (WES) was performed on two affected members of family A as well as on the affected individuals and the parents of family B and C, after obtaining written informed consent and study approval. WES led to the identification of recessive potentially damaging mutations in ADD3, all segregating with the disease as confirmed by Sanger sequencing ($NM_016824.4$: family A: homozygous c.1975G>C, p.E659Q; family B: compound

Table 1. Clinical phenotype of affected individuals.

	Family A				Family B	Family C	Kruer et al (3)
	II-1	II-3	II-6	II-3	II-4	II-1	4 affected sibs (II-1, II-2, II-3, II-4)
Sex	F	F	М	NK	F	М	II-1 and II-3: F II-2 and II-5: M
SRNS	Yes	Yes	Yes	NK	No	No	No
Age of onset of proteinuria (yrs)	7	12	<13	NA	No proteinuria	No proteinuria	NA
Renal histology	FSGS	FSGS	FSGS	NA	NA	NA	NA
Age of ESRD (yrs)	17	27	13	NA	NA	NA	NA
Heart disease	Dilated cardiomyopathy (dx 16 yrs), supra- ventricular arrhythmia (frequent auricular extra- systoles), heart failure	Dilated cardiomyopathy, arrythmia	Dilated cardiomyopathy (dx 8 yrs), arrhythmia (ventricular hyperexcitation), heart failure	NK	No	No	No
Neurological features	Borderline microcephaly. Intellectual disability. MRI–aspects of global demyelination. Axonal demyelinating motor-sensory neuropathy	CP: -1SD. Intellectual disability.	Borderline microcephaly (CP: -2SD). Intellectual disability. MRI-thin corpus callosum.	Corpus callosum agenesis	Microcephaly (CP: -3SD), Intellectual disability–moderate. MRI–partial agenesis of corpus callosum.	Microcephaly (CP: -2.4 SD), Intellectual disability. Intractable seizures. MRI– possible cortical dysplasia	Borderline microcephaly (all sibs). Intellectual disability—mild to severe (all sibs). Spastic plegia (all sibs). Thin corpus callosum (II-2). Supranuclear gaze palsy (II-2). Epilepsy (II-2). Convergence- retraction nystagmus and strabismus (II- 5). Strabismus (II-3)
Cataract	Congenital bilateral cataract	Congenital bilateral cataract	Bilateral cataract (6 yrs)	NK	Bilateral cataract	No	NK.
Other features	Mild facial dysmorphy (wide nasal bridge). <i>Arachnodactyly</i> , lax joints, cubitus valgus, scoliosis. Short stature.	Dysmorphic features similar to the two brothers	Facial dysmorphy (wide nasal bridge, slight proptosis). <i>Arachnodactyly</i> , short 4 th and 5 th metatarsals, conical phalanges. Lax joints, cubitus valgus scoliosis, spread iliac wings, short femural neck. Microcytic anemia	NK	Mild facial dysmorphy (wide nasal bride, bulbous nasal tip, narrow palpebral fissures). Fifth finger mid- phalanx hypoplasia, short 4 th and 5 th metatarsals. Short stature.	Facial dysmorphy. Short stature	
Age at last examination vs † age (yrs)	† 19	† 28	19.	ТОР	14	8	16 (II-1) 13 (II-2) 9 (II-3) 3(II-5)

Abbreviations are as follows: CP, cephalic perimeter; ESRD, end-stage renal disease; F, female; FSGS, focal segmental glomerulosclerosis; yrs, years; M, male; MRI, magnetic resonance imaging NA, not applicable; NK, not known; SRNS, steroidresistant nephrotic syndrome; SD, standard deviation; TOP, termination of pregnancy; yrs, years

†, deceased

https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007386.t001

heterozygous c.86A>G, p.N29S; c.1588G>A, p.V530I (both on the same allele in the mother), c.995A>G, p.N332S (heterozygous in the father); family C: homozygous c.995A>G, p.N332S) (Fig 2A and 2B and Table 2). In 148,632 reference individuals from the gnomAD browser



Fig 1. Clinical phenotypes of affected individuals. (A, B) Individuals II-6 (A; family A) and II-4 (B; family B) both show short 4th and 5th metatarsals. (C) Individual II-6 (family A) shows thin corpus callosum in the brain MRI at 17 months as well as hand arachnodactyly in the skeletal radiography. (D) Individual II-4 (family B) shows partial agenesis of the corpus callosum in the brain MRI at 14 years as well as mid phalanx hypoplasia in digit V (arrow) in the skeletal radiography. (E) Kidney sections of affected individuals from family A. At 15 years old, 3 years after the proteinuria onset, individual II-3 showed mostly normal glomeruli but with hypertrophic podocytes (arrow) (left panel; methenamine-silver stain; 40x), while few glomeruli (middle panel) had segmental sclerosis of the glomerular tuft (arrow; trichrome stain; 40x). There were no major lesions of the tubular-interstitial compartment (left and middle). Individual II-6 (right panel) presented with end-stage renal disease at 13 years old and showed severe glomerulosclerosis of almost all the glomeruli with retraction of the glomerular tuft and hypertrophic podocytes (arrow) (methenamine-silver stain; 40x).

(http://gnomad.broadinstitute.org/), the *ADD3* mutations were present at low frequencies and only in the heterozygous state (Table 2).

The identified *ADD3* mutations result in the substitution of amino acids located in the head and tail region of the protein product adducin- γ (Fig 2B). In humans, adducins form heterotetramers that are composed of either adducin- α and - γ (the most widely expressed) or adducin- α and - β (restricted mainly to erythrocytes and specific brain regions) [9]. These heterotetramers regulate the actin cytoskeleton by capping the barbed ends of F-actin and by promoting the interaction between actin and spectrin [9, 10]. Recently, a homozygous mutation in *ADD3* was shown to cause cerebral palsy, epilepsy, borderline microcephaly, thin corpus callosum





Fig 2. Identification of homozygous missense mutations in *ADD3* and *KAT2B* and effect of *ADD3* and *KAT2B* mutations on protein levels in fibroblasts. (A) Pedigree and segregation status of mutations found in *ADD3* and *KAT2B*. Discovery of *ADD3* mutations in family B and C was facilitated by GeneMatcher [44]. Half red coloured circles or squares denote patients with neurological defects and half blue coloured symbols denote patients with SRNS and cardiomyopathy. + symbols indicate non-mutated alleles. Mutations and segregation were confirmed by Sanger sequencing. (B) Exon structure of human *ADD3* cDNA (long isoform NP_058432) and domains of adducin-γ protein. The relative position of *ADD3* mutations to protein domains and exons are indicated (arrows). All mutations also affect the short isoform of *ADD3* (NP_001112). Below each mutation, the phylogenetic conservation of the altered amino acid residues is shown. (C) Exon structure of human *KAT2B* cDNA and domains of KAT2B protein. PCAF-HD, p300/ CBP-associated factor homology domain; AT, acetyl transferase domain; B, Bromo domain. The relative position of *KAT2B* variation to protein domains and exons is indicated (arrow). The phylogenetic conservation of the altered amino acid residue is shown. (D, E) Adducin-γ (D) and KAT2B (E) protein levels in control and patient fibroblasts. Lysates of patient II-3 and II-6 (family A) fibroblasts and age-matched control fibroblasts (Ctrl 1 and 2) were analyzed by western blotting. Results were normalized to the loading control α-tubulin. Each quantification is shown in the lower panel (n = 3 independent experiments, student's t-test).

https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007386.g002

and intellectual disability in one family [7]. As the phenotype of this family shows overlap with all our families, particularly family C, our study supports the pathogenicity of the previously identified *ADD3* mutation.

A homozygous variant in *KAT2B* associates with the extended phenotypes in family A

Family A, which was characterized by additional cardiomyopathy and SRNS, exhibited another potentially damaging homozygous mutation in lysine acetyltransferase 2B (*KAT2B*). No other pathogenic variant was identifying after applying a set of filters excluding common variants in the general population (dbsnp>1%) or in our in-house database as well as variants predicted not to be deleterious. The *KAT2B* variant (*NM_003884.4*: c.920T>C, p.F307S) segregated with the disease and was not present in the reference individuals from the gnomAD browser (Fig 2A and Table 2). KAT2B is known to acetylate a variety of substrates, including histones (preferentially H3), and to function as a transcription coactivator together with CBP/ p300 [11–13]. The identified *KAT2B* missense variant affects a highly conserved amino acid within the PCAF homology domain (Fig 2C), which is required for the interaction with CBP/ p300 [14].

By studying mRNA and protein expression in patient fibroblasts from affected members of family A using qPCR, western blotting and immunostainings, we found no significant decrease for adducin- γ at the mRNA or protein level (Fig 2D and S1A and S1C Fig). However, KAT2B protein (but not mRNA) levels were significantly reduced (Fig 2 and S1B and S1D Fig). Thus, we reasoned that the *KAT2B* variant could contribute to the extended phenotype observed in family A. To test this hypothesis, we decided to perform functional validation of both mutations in *Drosophila melanogaster*.

Table 2.	Pathogenic genetic	variants identified in	n affected individuals	with overlapping syndromes.
----------	--------------------	------------------------	------------------------	-----------------------------

Family/ Individual	Gene	Nucleotide change	Amino acid change	Zygosity, Segregation	MT	SIFT	PolyPhen-2	gnomAD allele frequencies
A/II-3, II-6	ADD3	c.1975G>C	p.E659Q	НОМ	DC	0.13 (T)	0.980 (PD)	4/246110 (no HOM)
	KAT2B	c.920T>C	p.F307S	НОМ	DC	0 (D)	0.990 (PD)	Not reported
B/II-3, II-4	ADD3	c.86A>G	p.N29S	het m	DC	0.25 (T)	0.653 (PoD)	17/276960 (no HOM)
		c.995A>G	p.N332S	het p	DC	0.03 (D)	0.995 (PD)	176/276966 (no HOM)
		c.1588G>A	p.V530I	het m	DC	0 (D)	1 (PD)	9/276822 (no HOM)
C/II-1	ADD3	c.995A>G	p.N332S	НОМ	DC	0 (D)	0.995 (PD)	176/276966 (no HOM)

Abbreviations are as follows: D, deleterious; DC, disease causing; het, heterozygous; HOM, homozygous; m, maternal; MT, mutationtaster; p, paternal; PD, probably damaging; PoD, possibly damaging; T, tolerated

https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007386.t002

Adducin- γ E659Q is a hypomorphic mutation in *Drosophila*

Drosophila hu li tai shao (hts) corresponds to the sole homolog of all three adducin genes in humans. As previously described [15], hts^{null} hemizygous animals died at the late larval stage, with only a few escapers progressing into adult stage. The escapers showed rough eyes, uncoordinated movements and inability to fly leading to death within 24h after eclosion (S2A Fig). For mutation validation, we re-expressed in this *hts^{mull}* background the human wild-type (WT) and mutant constructs using the ubiquitous driver tubulin (tub)-GAL4 (see S1 Table for precise genotypes). As E659, the amino acid mutated in adducin- γ , is located in a very poorly conserved region (Fig 2B), we performed rescue experiments with WT and mutated human adducin- γ . While re-expressing each of the adducins alone failed to rescue the viability, the coexpression of adducin- α and - γ (hereafter referred to as adducin- $\alpha\gamma$ WT) led to around sixty percent of viable mutant adults (Fig 3A). Importantly, when co-expressing adducin-γ E659Q together with adducin- α (adducin- α Y E659Q), we observed a significantly reduced partial rescue of fly viability (Fig 3A). The surviving animals did not present with any defects in eye and wing morphology (S2A Fig) but showed climbing impairment in a geotaxis assay (Fig 3B) [7]. To express the transgenes with endogenous expression levels, we also used an available GAL4 insertion in the *hts* locus. This insertion leads to a partial lethality over *hts*^{*null*}, which could be fully restored by adducin-αγ WT but not by E659Q (S3A Fig). Altogether, these results suggest that adducin- γ E659Q is a hypomorphic mutation.

KAT2B F307S is a loss-of-function mutation in Drosophila

Drosophila Gcn5 is homologous with KAT2B and its paralog KAT2A. Gcn5^{E333st} hemizygous animals died at late larval stage/early pupal stage as previously reported for this null mutation [16]. The expression of Drosophila Gcn5 (hereafter referred to as Gcn5 WT) with tub-GAL4 or another ubiquitous driver (daughterless (da)-GAL4) led to a full rescue (S3B Fig and Fig 3C). By contrast, the expression of human KAT2A and KAT2B, either alone or in combination, did not restore the viability of the mutant (Fig 3C), suggesting that the human orthologs have evolved in structure and function in comparison to Gcn5. As the mutated amino acid in KAT2B, F307, is conserved in Drosophila Gcn5 (corresponding to Gcn5 F304), we reexpressed Gcn5 F304S in the Gcn5^{E333st} hemizygous background (Gcn5 F304S). As a negative control, we re-expressed a predicted potentially damaging KAT2B variant (S502F corresponding to Gcn5 S478F) found in a homozygous state in a healthy individual from our in-house database. While Gcn5 S478F rescue animals were normal (Fig 3C and S3B Fig), Gcn5 F304S had a dramatically decreased viability with death occurring either in pupal stages or a few days after eclosion (Fig 3C). All adult escapers showed blistered wings, inability to fly and rough eyes and around 40 percent of the animals had defects in leg morphology (Fig 3D and 3E). Interestingly, this phenotype corresponds to what has previously been described for the deletion of the entire PCAF homology domain, where the mutation is localized [16]. In agreement with the proposed function of Gcn5 in histone acetylation [16], we further detected histone (H3K9) acetylation defects for Gcn5 F304S but not for Gcn5 WT and control animals, as assessed by immunoblotting of larval nuclear extracts (Fig 3F), suggesting that the mutation impairs the enzymatic activity of Gcn5. Altogether, the results suggest that KAT2B F307S is a loss-of-function mutation in Drosophila.

KAT2B F307S but not ADD3 E659Q causes cardiac defects in Drosophila

Since the presence of SRNS and heart defects in family A was the main phenotypic difference from the other families, we looked more specifically into the cardiac and renal system of the fly. The *Drosophila* heart is a tubular organ formed by contractile cardiomyocytes that pump

















Е

Phenotype quantification



Fig 3. Effect of ADD3 and KAT2B mutations on viability and morphology in Drosophila. (A) Viability for hts^{null} hemizygous flies and respective rescues with adducin (Add) construct(s) using tubulin-GAL4 (tub>). After 48h of egg laying on standard cornmeal/yeast food, viability was calculated as the percentage of hatching adults of the indicated genotype and normalized to the control. The control corresponds to the viable F1 trans-heterozygous flies obtained from the cross between Df(2R)BSC26 (harbouring the hts gene) and a nonoverlapping deficiency on the same chromosome (Df(2R)247). Quantification is for >100 F1 eclosing flies/genotype/experiment in 5 independent experiments. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA with Bonferroni post-test. (B) Negative geotaxis assay for one-day-old adult flies. Flies were transferred to a graduated tube, and after tapping, the length climbed in 8 sec was recorded [45]. Quantification was performed on 6 independent experiments with >38 flies/genotype using one-way ANOVA with Kruskal-Wallis posttest. ns, non significant (see S1 Table for details on transgenic flies). For all panels: ns, non significant, *p<0.05 **p<0.01, ***p<0.001 (see S1 Table for details on transgenic flies). (C) Viability for Gcn5^{null} hemizygous flies and respective rescues with Gcn5 and KAT2A/B construct(s) using daughterless-GAL4 (da>). Viability was assessed as described in (A). Human KAT2B F307S and S502F mutations correspond to Gcn5 F304S and S478F mutations, respectively. Gcn5 S502F variant predicted to be deleterious (PolyPhen-2 score of 0.98) was found on a healthy individual at the homozygous state in our in-house exome database. The control corresponds to the viable F1 transheterozygous flies obtained from the cross between Df(3L)sex204 (harbouring the Gcn5 gene) and a non-overlapping lethal mutant on the same chromosome (CG3103^{0MI0010}). Quantification is for >100 F1 eclosing flies/genotype/experiment in 5 independent experiments. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA with Bonferroni post-test. (D) Phenotype of Gcn5 WT, Gcn5 F304S and Gcn5 S478F rescue animals. Pictures correspond to adult flies one day post-eclosion and are representative of the defects found in wings (separated wing blades), legs (femur kinking, arrow) and eye (small and mild rough eye). Scale bars: wings: 500 µm, legs: 500 µm, eye: 200µm. (E) Quantification of the defects in wings, legs and eyes found in Gcn5 F304S rescue flies is for >100 F1 eclosing flies/genotype. (F) H3K9 acetylation levels of Gcn5^{null} and Gcn5 WT and F304S rescue animals. Extracted nuclear proteins from 3rd instar (= late) larvae were analysed by western blotting normalized to non-acetylated Histone 3 (H3). Quantification is shown in the lower panel (n = 3 independent experiments; one-way ANOVA with Bonferroni post-test). For all panels: ns, non significant, *p<0.05 **p<0.01, ***p<0.001 (see S1 Table for details on transgenic flies).

https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007386.g003

the hemolymph (analogous to the blood in vertebrates) to the rest of the body. This organ system has proven to be an important tool for studying the genetics and pathophysiology of cardiac disease [17, 18]. Therefore, we studied heart function in adult adducin and Gcn5 rescue flies. As illustrated in the M-mode traces obtained from high-speed movies, adducin- $\alpha\gamma$ E659Q did not show any significant differences in heart period, cardiac output, fractional shortening and arrhythmia index when compared to adducin- $\alpha\gamma$ WT (Fig 4). By contrast, Gcn5 F304S flies showed prolonged heart period and reduced cardiac output compared to Gcn5 WT and control flies (Fig 5A-5E). Both Gcn5 WT and F304S rescue flies showed a reduction in the normal diastolic diameter compared to control flies (Fig 5F), but only for Gcn5 F304S there was a reduction in contractility, measured as fractional shortening (Fig 4G). Moreover, the Gcn5 F304S mutant showed a more irregular heartbeat compared to Gcn5 WT, reflected by an increase in the arrhythmia index (Fig 5H). In further support of Gcn5's requirement for normal heart function, the silencing of Gcn5 with a heart-specific driver (tin>GAL4) led to a decreased cardiac output, an increased arrhythmia index and shortened diastolic diameter (S4B-S4D Fig). Interestingly, while the knockdown of hts did not cause any significant heart phenotypes (S4A–S4F Fig), the co-expression of *hts*^{*RNAi*} and *Gcn5*^{*RNAi*} significantly aggravated the heart period length and the arrhythmia index observed upon single knockdown of Gcn5 (S4A and S4C Fig). The silencing efficiency for both RNAi lines were confirmed by qPCR and immunocytochemistry (S5A-S5D Fig). Altogether, the results suggest that Gcn5 is important for heart function in Drosophila and that Hts deficiency can increase the phenotypic consequences of Gcn5 knockdown.

KAT2B F307S but not adducin-y E659Q causes renal defects in Drosophila

The fly kidney is composed of garland and pericardial nephrocytes (Fig 6A) that perform the filtration of the hemolymph and Malpighian tubules that function as excretory tubes. The surface of nephrocytes is decorated with actin-anchored slit diaphragms showing high molecular similarity with those of mammalian podocytes [19–21]. Therefore, nephrocytes have successfully been used to functionally validate candidate genes for SRNS [22, 23].

By immunostaining, we observed that endogenous Hts localizes below the slit diaphragms at the cell cortex of larval garland nephrocytes (Fig 6B). A similar localization pattern was



Fig 4. Effect of Gcn5 F304S mutation on *Drosophila* heart function. (A-C) M-mode kymographs of 1 day old beating hearts of control flies (*yw/Df(3L*); A) and Gcn5^{*null*} flies rescued with Gcn5 WT (B) or Gcn5 F304S (C). Scale bar: 1 second. (D-H) High-speed movies of beating hearts were analysed using semi-automated Optical Heartbeat Analysis [46]. For quantification, 8–19 flies were analyzed. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA and Tukey's multiple comparison for all parameters except arrhythmia index (H), which was analysed using Mann-Whitney-Wilcoxon. For all panels: ns, non significant, *p<0.05 **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001 (see S1 Table for details on transgenic flies).

PLOS GENETICS

found when adducin- γ was overexpressed with its binding partner adducin- α . In this case, adducin- γ protein levels were significantly increased compared to expressing adducin- γ alone, suggesting that the stabilization by adducin- α is a prerequisite for proper function (S6 Fig). For Gcn5, we found a prominent expression in nephrocyte and podocyte nuclei (Fig 6C). The endogenous localization patterns were specific as they were lost upon *hts* and *Gcn5* knockdown, respectively (S5A and S5B Fig).

To study the requirements of Hts for the integrity of the slit diaphragm, we performed immunostainings for Kirre, the ortholog of the mammalian slit diaphragm protein Neph1 [24]. In line with the proposed role for adducin- γ in cortical actin regulation [25], we found that *hts^{null}* larval garland nephrocytes showed a decrease of Kirre between adjacent nephrocytes (Fig 7A and 7B). When rescued with adducin- $\alpha\gamma$ WT and E659Q transgenes, however, no major differences with respect to Kirre localization were seen in larval garland nephrocytes



Fig 5. Effect of adducin- $\alpha\gamma$ **E559Q on** *Drosophila* heart function. (A-C) M-mode of beating 2-week-old control (*yw/Df*(2*R*); A), adducin- $\alpha\gamma$ WT (B) and adducin- $\alpha\gamma$ E559Q (C) rescue hearts. Scale bar: 1 second. (D-H) High-speed movies of beating adducin- $\alpha\gamma$ WT, adducin- $\alpha\gamma$ E559Q rescue and control hearts were analysed using semi-automated Optical Heartbeat Analysis [46]. For quantification, 8–19 flies were analyzed. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA and Tukey's multiple comparison, except for Arrhythmia index (H; n = 8–19, Mann-Whitney-Wilcoxon). For all panels: ns, non significant, ***p<0.001 (See <u>S1 Table</u> for details on transgenic flies).

(Fig 7A and 7B). Similarly, the morphology and number of adult pericardial nephrocytes were normal in both rescue animals compared to the control (Fig 7C and 7D).

Gcn5^{E333st} hemizygous larvae presented with morphologically normal nephrocytes. Yet, we did detect a decreased H3K9 acetylation at this stage in the nephrocyte nuclei of the mutant, which could be rescued by Gcn5 WT but not by Gcn5 F304S (Fig 8A). Moreover, the majority of adult Gcn5 F304S escapers showed mislocalized and/or abnormally shaped pericardial nephrocytes in the adult stage that were often reduced in number (Fig 8B–8D), consistent with previously reported characterizations of important podocyte genes [26–28].

Together, the results demonstrate that, while Hts is important for nephrocyte function, the *ADD3* missense mutation identified in family A is alone insufficient to cause a renal phenotype in flies. By contrast, Gcn5 F304S seems to impair Gcn5 function in nephrocytes.

Synergistic effects of hts and Gcn5 in Drosophila nephrocytes

To address any functional synergism between Gcn5 and Hts in nephrocytes, we performed nephrocyte-specific silencing of *Gcn5* and *hts* alone or in combination. In larval nephrocytes,



Fig 6. Expression and localization of Hts and Gcn5 in garland nephrocytes. (A) Schematic drawing of the localization of garland nephrocytes (GNs) and pericardial nephrocytes (PNs). The garland cells are attached to the proventriculus (PV) whereas the pericardial nephrocytes are lining the heart tube (HT). (B, C) Dissected wild-type (WT) garland nephrocytes were stained for Hts (B; green) and Gcn5 (C; green). At the time of dissection, larvae were in the third instar stage (the same for all other garland nephrocyte stainings). Kirre is in red (B). Nuclei were stained with Hoechst (B,C; blue). Scale bars: 10 μm.

the double knockdown of *Gcn5* and *hts* caused an increase in Kirre mislocalization, compared to the single knockdowns (S7A and S7B Fig). Moreover, while in 3-day-old adults *hts* knockdown did not affect pericardial nephrocyte number (Fig 9A–9C), a significant decline of differentiated nephrocytes could be observed in 15-day-old adults (Fig 9D). Similarly, the nephrocyte-specific expression of $Gcn5^{RNAi}$ caused a progressive decline of differentiated pericardial nephrocytes at 15 days, but not at 3 days post eclosion (Fig 9A–9D). By contrast, the double knockdown of *Gcn5* and *hts* caused a significant loss of differentiated nephrocytes already at 3 days post-eclosion (Fig 9A–9C).

Making use of the double knockdown phenotype, we also addressed the synergism between *ADD3* and *KAT2B* mutations from family A. Considering that the *KAT2B* variant corresponds to an almost complete loss of function mutation, we performed a double knockdown of *Gcn5* and *hts* rescued only with the adducin- $\alpha\gamma$ transgenes, thereby avoiding the complexity of bringing all the *Gcn5* and *hts* alleles as well as the GAL4 driver and respective rescue constructs together in one fly. In this setting, the adducin- $\alpha\gamma$ WT combination partially rescued the loss of pericardial nephrocytes in 3-day old adult flies (Fig 10A and 10B). By contrast the expression of the adducin- $\alpha\gamma$ E659Q combination showed the same degree of nephrocyte loss as the double knockdown at this stage. Together, these results suggest a functional interaction between *KAT2B* and *ADD3* mutations in the nephrocyte, which may be of relevance for the renal phenotypes in family A.

Synergistic effects of adducin- γ and KAT2B in human podocytes

To validate our findings in human cells, we studied adducin- γ and KAT2B in cultured human podocytes. While KAT2B was as expected found in nuclei of podocytes, adducin- γ localized to



Fig 7. Garland nephrocyte phenotype of hts^{null} and adducin- $\alpha\gamma$ rescue mutants. (A) Kirre and Pyd localization in hts^{null} and rescue mutant garland nephrocytes. Dissected nephrocytes of the indicated genotypes were stained for Kirre (red) and Pyd, corresponding to Neph1 and ZO-1 in vertebrates, (blue). Arrowheads show areas of cell fusion. Scale bar: 10µm. (B) Quantification of nephrocytes showing a continuous Kirre staining using >9 samples/ genotype from 3 independent experiments. Statistical analysis was performed with Kruskal-Wallis with Dunn's post-test. ns, non significant, *p<0.05, ***p<0.001 (see S1 Table for details on transgenic flies). (C) Pericardial nephrocytes in adducin- $\alpha\gamma$ WT and E559Q rescue and control adult flies at 15 days post-eclosion were stained for the differentiation markers Kirre (red) and Pyd (blue). Note that hts^{null} is lethal at this stage. Scale bar: 30µm. (D) Quantification of the number of pericardial nephrocytes from n>8 samples/genotype in 3 independent experiments. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA with Bonferroni's post-test. ns, non significant (See S1 Table for details on transgenic flies).

https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007386.g007





Fig 8. Effect of *Gcn5/KAT2B* variant on histone acetylation and survival of *Drosophila* nephrocytes. (A) Acetylated H3K9 in larval garland nephrocytes of *Gcn5^{null}* and Gcn5 WT and mutant rescue animals. *Dorothy* (*Dot*)-GAL4 (a nephrocyte specific driver) is used in combination with *da*-GAL4 as the latter shows only minor expression in nephrocytes. Garland nephrocytes of the indicated genotypes were stained for acetylated H3K9 (red) and Hoechst (blue). Scale bar: 5 µm. (B) Pericardial nephrocytes in adult *Gcn5* rescue mutant flies (7–15 days after eclosion) that express transgenic GFP (green) driven under the *Hand* promoter (*Hand*-GFP), specific for nephrocytes and cardiomyoblasts. Dissected pericardial nephrocytes were fixed with PFA and observed directly for GFP signal. Scale bar: 30 µm. (C) Pericardial nephrocytes in adult *Gcn5* rescue mutants (7–15 days after eclosion). Dissected pericardial nephrocytes of the indicated genotypes were stained for the differentiation markers Kirre (red) and Pyd (blue). Scale bar: 30 µm. (D) Quantification of the pericardial nephrocytes for the indicated genotypes were stained for the differentiation markers Kirre (red) and Pyd (blue). Scale bar: 30 µm. (D) Quantification of the pericardial nephrocytes in *Gcn5^{null}* rescue mutants (n>13/genotype; 3 independent experiments; Chi-square test). Nephrocytes with abnormal distribution, abnormal shape, multinucleated or fragmented nuclei and reduced number of nephrocytes (<20). Phenotype severity was scored as normal (0), medium (1), intermediate (2) and severe (>2). For all panels: ns, non significant, ** p<0.001 (see S1 Table for details on transgenic flies).

https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007386.g008







the cell periphery similar as in nephrocytes (S8A–S8D Fig). Both localization patterns were specific, as they were reduced upon lentiviral transduction of respective shRNAs and could be restored by re-expression of both wild-type and even mutant adducin- γ and KAT2B (S8A–S8D Fig).





Fig 10. Synergism between ADD3 E659Q and Gcn5 knockdown in nephrocytes and effect of the double knockdown of ADD3 and KAT2B in human cultured podocytes. (A, B) WT or mutated adducin rescue constructs were expressed in *hts* and *Gcn5 double knockdown* pericardial nephrocytes to study the interaction between E659Q mutation and gcn5 loss of function. (A) Immunostaining was performed for Kirre (red) and Pyd (blue). Images are representative of pericardial nephrocytes dissected from adult flies at 3 days post-eclosion. Scale bar: 30μ m. (B) Graphs represent quantification of the number of pericardial nephrocytes at the same time point using >20 samples/genotype from 3 independent experiments. Statistical analysis was performed with One-way ANOVA with Dunnett's post-test. For all panels: **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001 (See S1 Table for details on transgenic flies). (C) Adhesion was assessed using the xCELLigence system (ACEA Biosciences). Cells were plated with complete medium in the E-plate 96. Data obtained were analyzed with the RTCA software. Results are presented as time *vs*. cell index curve (n = 3 independent experiments; linear regression analysis). (D) Migration was assessed using the Incucyte Scratch wound cell migration assay (Essen Bioscience). Cells were plated with complete medium 48 hours before scratch in ImageLock Plates-96 wells (Essen Bioscience) and images were recorded every 45 minutes after scratch until complete wound closure. Images were analyzed using the Incucyte Zoom software. Results are presented as percentage of wound cell density over time (n = 3 independent experiments; linear regression analysis). For all panels: **p<0.01, ****p<0.001, ****p<0.001.

To address the phenotypic effects of the *ADD3* and *KAT2B* knockdowns, we analyzed adhesion and migration, which are processes typically affected in kidney diseases such as SRNS [29, 30]. While podocyte adhesion was reduced in the single *ADD3* and *KAT2B* knockdowns, the double knockdown showed additive effects (Fig 10C). With regard to migration, the single

knockdown showed a mildly increased migration. By contrast, the double knockdown led to a strongly impaired migration (Fig 10D), providing further evidence for potential synergistic effects of mutations in both genes in the kidney.

Discussion

Here, we identify *ADD3* mutations in three different families with similar neurological, skeletal and ophthalmological phenotypes, thereby consolidating and expanding the mutational and phenotypic spectrum of *ADD3* deficiency reported initially. Moreover, we use functional validation in *Drosophila* and human cells to characterize the contribution of an additional variant in *KAT2B* to the extended phenotype featuring one of the *ADD3* families. While such additional variants are commonly excluded from WES datasets without even performing functional validation, particularly when the respective gene functions seem to be unrelated to the disease(s) in question, our results demonstrate that both the *ADD3* and the *KAT2B* mutation could be pathogenic. Moreover, we show that *ADD3*-associated phenotypes can be unmasked by additional Gcn5/KAT2B deficiency in nephrocytes and human podocytes. Our study thus provides an example of a genetic disease where the tissue manifestation could be influenced by a second homozygous mutation on another chromosome.

KAT2B has previously not been associated with any genetic disease. The severity of the *KAT2B* variation in the fly model compared with the relatively late-onset cardiac and renal defects in the patients indeed suggests a partial functional redundancy due to gene duplication in vertebrates. Accordingly, it has been shown that in mouse development loss of KAT2B can be compensated for by KAT2A [31]. Nevertheless, KAT2B is strongly expressed in mouse heart and kidney, particularly podocytes [32, 33], while KAT2A has a more widespread expression pattern [14]. Moreover, mouse and zebrafish studies have shown that KAT2B can perform functions that are non-redundant with KAT2A, even in the heart [34–39], indicating that *KAT2B* deficiency alone could be sufficient for any clinical manifestations. What remains to be seen is whether the clinical impact of *KAT2B* deficiency needs to be uncovered by a sensitized genetic background, such as the *ADD3* mutation, or whether it is the other way around. While our data do not exclude either possibility, it is interesting that rare but otherwise uncharacterized variants of *KAT2B* have been found to be enriched in a patient cohort with sporadic FSGS [32], suggesting that KAT2B could be a susceptibility factor for FSGS forms with different primary causes.

At the level of protein function and disease mechanism, the precise mode of interaction between adducin- γ and KAT2B is equally unclear. Apart from histones, KAT2B has recently been shown to acetylate a variety of proteins [40]. Among them are also cytoskeletal regulators, that when mutated cause FSGS or cardiomyopathy (e.g. actinin-4, TTC21B and myosin-7). Thus, it is possible that adducin- γ could also be a target of KAT2B-dependent acetylation. Vice versa, any influence of adducin- γ deficiency on the activity of KAT2B cannot be excluded. Apart from more mechanistic functional studies, the identification of more patients with the same or other variants in only *ADD3* or *KAT2B* combined with careful characterization of their phenotypes will be crucial to define the precise role of each gene and their potential functional interaction in humans.

Materials and methods

Ethical statement

Following informed written consent, we obtained clinical data, blood samples and skin biopsies from the affected individuals. This study was conducted with the approval of the Comité de Protection des Personnes pour la Recherche Biomédicale Ile de France II. Approval was obtained under the number DC 2014–2272

Whole exome sequencing

Whole-exome sequencing (WES) was performed for affected individuals II-3 and II-6 from family A and for the two parents and the affected sib from family B and family C. Whole-exome capture was performed with the Agilent SureSelect Human All Exon Kit, 51Mb, V4 (family A), the Roche MedExome kit (family B) or a proprietary system from GeneDx (family C). The enriched library was then sequenced on either Life Technologies SOLID (paired end with 75+35 base pair (bp) reads; family A) or Illumina systems (family B: 2x150 bp reads; family C: 2x100bp read). Images were analyzed and the bases were determined according to Life-scope or bcl2fastq Conversion Software v2.17. Variants were called as described [41].

Fly strains and generation of transgenic flies

Crosses were maintained on standard cornmeal-yeast food at 25 °C except for RNAi crosses (29 °C). The fly stocks were used in this study can be found in <u>S1 Table</u>. For *Hts^{null}* rescue constructs we used an N-terminal V5 tagged human *ADD3* (clone IMAGE: 6649991), WT or carrying the E659Q mutation, and the N-terminal HA tagged human *ADD1* (gift from Vann Bennett, Duke University). For *Gcn5^{null}* rescue constructs we used the C-terminal HA tagged human *KAT2B* (clone IMAGE: 30333414), the N-terminal Flag tagged human *KAT2A* (gift from Laszlo Tora, Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Strasbourg) and the C-terminal Flag tagged *Drosophila Gcn5*, WT (gift from Clement Carré, University Pierre et Marie Curie) or carrying the mutations F304S or S478F (corresponding to human mutation F307S and S502F). All mutations were inserted using the QuickChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene) according to the manufacturer's protocol. Subsequently, the rescue constructs were subcloned into a *pUASTattB* vector (gift from *Konrad Basler*, University of Zurich) and injected into flies at *attP* landing sites by Bestgene, USA.

Cell culture

A conditionally immortalized human podocyte cell line developed by transfection with the temperature-sensitive mutant (tsA58) of the SV40-T-antigen-encoding gene, was kindly provided by Dr. Saleem (University of Bristol). In brief, the cells proliferated at the permissive temperature of 33 °C, whereas growth arrest and differentiation were induced by incubation at the nonpermissive temperature of 37 °C for 14 days. Cells were grown with 7% CO_2 in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum, insulin-transferrin-selenium, glutamine, penicillin and streptomycin (all from Life Technologies).

Primary skin fibroblasts were obtained from individual II-3 and II-6 from family A and two different age matched controls. These cells were grown in OPTIMEM medium supplemented with 20% fetal bovine serum, glutamine, penicillin and streptomycin (all from Life Technologies) at 37°C with 7% CO2.

Establishment of lentiviral cell lines

Small hairpin RNAs (shRNAs) Scramble (Scb) or targeting the 3'UTR of human *ADD3* and *KAT2B* mRNA in the lentiviral vector pLKO.1 were purchased from Sigma (*ADD3* clone: NM_019903.3-2280s1c1 TRCN0000123024; *KAT2B* clone: NM_003884.4-3192s21c1, TRCN0000364135). Lentiviral particles containing these constructs were produced in human embryonic kidney 293T cells as previously described [42]. *ShScb*, *ADD3* or *KAT2B* depleted

podocytes were obtained by transduction with the respective shRNAs lentiviral particles and subsequent puromycin selection.

Human *ADD3 and KAT2B*, were subcloned from human full-length cDNA (*ADD3*: clone IMAGE: 6649991; *KAT2B* clone IMAGE: 30333414) into the expression vectors pLentiGIII and PLEX-MCS, respectively. An HA tag was added in frame, before the stop codon, to the C terminus of *ADD3* and *KAT2B*. The *ADD3* E659Q and *KAT2B* F307S mutations found in affected individuals were introduced with the QuickChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene) according to the manufacturer's protocol. All constructs were verified by sequencing. *ADD3* or *KAT2B* depleted podocytes were transduced with WT or mutant *ADD3* or *KAT2B* lentiviral particles, respectively.

RNA extraction, RT-PCR and real time quantification

Total RNA was isolated using a Qiagen RNA extraction kit (Qiagen), following the manufacturer's instructions. cDNA was prepared using reverse transcriptase Superscript II (Invitrogen). PCR was performed using ReadyMix Taq PCR (Sigma). After RNA extraction and cDNA preparation by RT-PCR, relative expression levels of genes of interest were determined by real-time PCR using the Absolute SYBR Green ROX Mix (ABgene) and specific primers as follows: *ADD3* forward 5'-CTTGCTGGAATTGTTGTGGATAAG-3' and reverse 5'-CTGGTGGGCCATGATCATC-3'; *KAT2B* forward 5'-ATCACACGGCTCGTCTTTGAC-3' and reverse 5'-CACCAATAACACGG CCATCTT-3'; *hts* forward 5'-GCACTCCGGATCCCAAGAAG-3' and reverse 5'-CAGGCACAA ACTGGAGTGGA-3', *Gcn5* forward 5'-CGATCGTCCAAGCAGTGAG-3' and reverse 5'-TCC GCCTTGACGTTCTCATC-3'. Experiments were repeated at least three times and gene expression levels were normalized to human HPRT or *Drosophila melanogaster* actin.

Immunoblotting

Total cell or third instar larvae total protein extractions were performed and the resolved proteins were probed using the primary antibodies: anti-PCAF rabbit monoclonal (3378, Cell Signaling,1:1000), anti-adducin- γ mouse monoclonal (sc-74474, Santa Cruz, 1:1000) and anti- α tubulin mouse monoclonal (T5168, Sigma Aldrich, 1:5000). For immunoblotting of nuclear extracts [43], the primary antibodies anti-acH3K9 rabbit polyclonal (39918, Active motif, 1:1000) and anti-H3 mouse monoclonal (61475, Active motif, 1:1000) were used as well as the corresponding HRP-conjugated secondary antibodies (Amersham ECL, GE healthcare and Invitrogen). Bands were visualized using Amersham ECL Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare) and quantified by densitometry using *Image J* software.

Immunofluorescence

Fibroblasts or podocytes were plated on noncoated coverslips or coverslips coated with rat-tail collagen type I (Corning), respectively. After 48h of culture cells were fixed with 100% ice-cold ethanol. Cells were incubated with a blocking solution (PBS, 1% BSA, and 0.1% tween 20) and further permeabilized for ten minutes with PBS 0.1% Triton. Incubation with the following primary antibodies was done ON at 4°C: anti-PCAF mouse monoclonal (sc-13124, Santa Cruz, 1:100), anti-adducinγ rabbit polyclonal (sc-25733, Santa Cruz, 1:100) and anti-HA (11 867 423 001, Roche, 1:200).

For immunofluorescence in *Drosophila*, garland and pericardial nephrocytes were dissected from third instar larvae and adults, respectively, and fixed for 20 minutes in 4% paraformaldehyde at room temperature and stained according to standard procedures. For Kirre stainings an alternative fixation method ("heat fixation") was used: nephrocytes were heat-fixed for 5 seconds at 90°C in 0.7% NaCl/0.05% TX-100 solution. The following primary antibodies were used: anti-Hts mouse monoclonal (#1B1 deposited to the Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB) by Lipshitz, H.D.), anti-Gcn5 rabbit polyclonal (gift from Jerry Workman, Stowers Institute for medical research, Kansas, 1:200) anti-Kirre rabbit polyclonal (gift from Karl Fischbach, Institute for Biology, Freiburg, Germany, 1:200), anti-Pyd2 mouse monoclonal (deposited to the DSHB by Fanning, A.S, 1:100), anti-acH3K9 rabbit polyclonal (#06-942, Upstate, 1:100), AlexaFluor488-conjugated anti-horseradish peroxidase (Jackson Immunoresearch, 1:400), anti-HA (11 867 423 001, Roche, 1:200) and anti-V5 rabbit polyclonal (v8137 Sigma, 1:200). The corresponding anti-isotype AlexaFluor antibodies (ThermoFisher Scientific, 1:200) were used at room temperature for 2 hours. Nuclei were stained with Hoechst. Confocal images were obtained with a Leica TCS-SP8 confocal microscope, and post-treatment analysis was performed with *Image J* software.

Statistical analyses

Results are presented as means \pm standard error or standard deviation for the indicated number of experiments. Statistical analysis of continuous data was performed with two-tailed Student *t* test for pairwise comparisons or one-way analysis of variance for comparisons involving three or more groups, with Dunnet's, Bonferroni or Dunn post hoc test, as appropriate. Pearson's chi-squared test was used for analysis of categorical data. Linear relations between variables were analysed using linear regression analysis. P<0.05 was considered statistically significant. Analysis was carried out with GraphPad Prism software. (*p<0.05; **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.001). All experiments were performed at least three times.

Supporting information

S1 Fig. mRNA levels and subcellular localization of ADD3 and KAT2B in control and patient fibroblasts. (A, B) ADD3 (A) and KAT2B (B) mRNA levels in patient fibroblasts were assessed by quantitative PCR. Experiments were repeated at least three times and gene expression levels were normalized to the house keeping gene *HPRT*. Statistical analysis was performed using student's t-test; ns, non-significant. (C, D) Immunostaining was performed for adducin- γ (green; C) and KAT2B (green; D) in control and patient fibroblasts. Nuclei were stained with Hoechst (blue). Note the loss of nuclear staining for KAT2B in patient fibroblasts. Scale bars: 10 µm.

(TIF)

S2 Fig. Morphology of *hts*^{*null*} **flies and adducin-***α*γ **WT or E659Q rescue mutants.** Representative pictures of *hts*^{*null*} and respective adducin-*α*γ WT and E659Q rescue mutants one day post-eclosion. *hts*^{*null*} flies have rough eye and motor coordination defects and are unable to fly. The ubiquitous co-expression of adducin-*α* and -*γ* using *tub*-GAL4 rescues these defects regardless of the presence of the E659Q mutation. Scale bars: upper panel: 1mm, wings: 500µm, eye: 200µm.

(TIF)

S3 Fig. Rescue experiments with alternative drivers. (A) Rescue of *hts* mutant viability defects with adducin- $\alpha\gamma$ transgenes driven by a GAL4 insertion in the endogenous *hts* locus. After 48h of egg laying on standard cornmeal/yeast food, viability was calculated as the percentage of eclosing adults of the indicated genotype and normalized to the control. The control corresponds to the viable F1 trans-heterozygous flies obtained from the cross between Df(2R) *BSC26* (harbouring the *hts* gene) and a non-overlapping deficiency on the same chromosome (Df(2R)247). The insertion of GAL4 in *hts* locus leads to partial lethality which is completely rescued by adducin- $\alpha\gamma$ WT but not by E659Q. Quantification is for >100 F1 eclosing flies/

genotype/experiment in >5 independent experiments. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA with Dunnett's post-test. (B) Viability for $Gcn5^{null}$ hemizygous flies and respective rescues using *tubulin*-GAL4 (*tub*>). Viability was assessed as described in (A). The control corresponds to the viable F1 trans-heterozygous flies obtained from the cross between Df(3L)sex204 (harbouring the Gcn5 gene) and a non-overlapping lethal mutant on the same chromosome ($CG3103^{0MI0010}$). Quantification is for >100 F1 eclosing flies/genotype/experiment in >5 independent experiments. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA with Bonferroni post-test. For all panels:ns, non significant, *p<0.05, **p<0.01, ****p<0.001, ****p<0.0001.



S4 Fig. Effect of cardiac-specific depletion of *hts* and *Gcn5* on *Drosophila* heart function. (A-F) *Tin*-GAL4 driver was used to knockdown *hts* or/and *Gcn5* in cardiomyocytes, and different heart parameters were analyzed in 3 week-old adult flies. Two separate control RNAi lines (TRIP and KK) were used to match $Gcn5^{RNAi}$ (TRIP) and hts^{RNAi} (KK), respectively. For quantification, 19–30 flies were analyzed. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA and Tukey's multiple comparison for all parameters except arrhythmia index, which was analysed using Mann-Whitney-Wilcoxon. For all panels: ns, non significant, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001.



S5 Fig. *Hts* and *Gcn5* RNAi validation in *Drosophila*. (A, B) Nephrocyte-specific knockdown of *hts* (A) and *Gcn5* (C) in nephrocytes was performed using using *pros*-GAL4. Dissected garland nephrocytes of the indicated genotypes (see also S1 Table) were stained for Hts (green; A) and Gcn5 (green; C). Nuclei were stained with Hoechst (blue). Scale bars: 10 μ m. (B, D) *Hts* (B) and *Gcn5* (D) RNAi knockdown validation was performed with tub-GAL4 and the fat body-specific lpp-GAL4, respectively. Note that the knockdown of Gcn5 with *tub*-GAL4 and *da*-GAL4 was lethal in the embryonic stage and thus could not be used for knockdown validation.

(TIF)

S6 Fig. Adducin- α and - γ co-expression in garland nephrocytes. The knockdown of *hts* and simultaneous re-expression of human HA-tagged adducin- α and V5-tagged adducin- γ was performed in garland nephrocytes with *prospero (pros)-GAL4* (see <u>S1 Table</u> for details on transgenic flies). Dissected garland nephrocytes of the indicated genotypes were stained for HA (green) and V5 (red). Nuclei were stained with Hoechst (blue). Scale bar: 10 µm. (TIF)

S7 Fig. Kirre localization in nephrocytes in single and double knockdown of *hts* and *Gcn5*. (A) *Pros-GAL4*-mediated knockdown of *hts* and/or *Gcn5* in garland nephrocytes. Dissected garland nephrocytes of the indicated genotypes were stained for Kirre (red) and Pyd (blue). Scale bar: 10µm. (B) Quantification of nephrocytes showing a continuous Kirre staining using >12 samples/genotype in 3 independent experiments. Statistical analysis was performed with Kruskal Wallis with Dunn's post-test. (TIF)

S8 Fig. Expression and subcellular localization of adducin- γ **and KAT2B in podocytes.** (A) Cell lysates from undifferentiated podocytes were analysed by western blotting using anti-adducin- γ . Anti- α -tubulin was used as a loading control. (B) Differentiated podocytes were stained for adducin- γ (green), HA (magenta) and DNA (blue). (C) Undifferentiated podocyte cell lysates were analysed by western blotting using the anti-KAT2B. Anti- α -tubulin was used

as a loading control. (D) Differentiated podocytes were stained for KAT2B (green) and HA (red). Scale bars: $20 \ \mu m$. (TIF)

S1 Table. Fly strains used in this study.

(DOCX)

Acknowledgments

We are grateful to Clement Carré, Jerry Workman, Karl Fischbach and the Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB) for providing antibodies. We thank Clement Carré, Jan Pielage, Takashi Suzuki, Barry Denholm, Zhe Han, Pierre Leopold, Manfred Frasch, the Bloomington stock center and Vienna *Drosophila* RNAi Center (VDRC) for providing flies. We are grateful to Vann Bennett, Clement Carré and Laszlo Tora for providing cDNA constructs. We thank the Cell Imaging platform, Structure Fédérative de Recherche de Necker, Inserm US24 for assistance with microscopy. We are grateful to Laurence Colleaux, Kalman Tory and Fred Bernard for critically reading the manuscript.

Author Contributions

Conceptualization: Sara Gonçalves, Corinne Antignac, Matias Simons.

Formal analysis: Sara Gonçalves, Julie Patat, Maria Clara Guida, Noelle Lachaussée.

Funding acquisition: Tobias B. Huber, Corinne Antignac, Matias Simons.

- **Investigation:** Sara Gonçalves, Julie Patat, Maria Clara Guida, Noelle Lachaussée, Christelle Arrondel, Martin Helmstädter, Olivia Boyer, Olivier Gribouval, Marie-Claire Gubler, Geraldine Mollet, Rolf Bodmer, Corinne Antignac, Matias Simons.
- Methodology: Sara Gonçalves, Julie Patat, Corinne Antignac, Matias Simons.

Project administration: Rolf Bodmer, Corinne Antignac, Matias Simons.

- **Resources:** Christelle Arrondel, Olivia Boyer, Olivier Gribouval, Marie-Claire Gubler, Geraldine Mollet, Marlène Rio, Marina Charbit, Christine Bole-Feysot, Patrick Nitschke, Patricia G. Wheeler, Devon Haynes, Jane Juusola, Thierry Billette de Villemeur, Caroline Nava, Alexandra Afenjar, Boris Keren, Rolf Bodmer, Matias Simons.
- Supervision: Rolf Bodmer, Corinne Antignac, Matias Simons.
- Validation: Sara Gonçalves, Julie Patat, Maria Clara Guida, Noelle Lachaussée, Rolf Bodmer, Corinne Antignac, Matias Simons.
- Visualization: Sara Gonçalves, Julie Patat, Maria Clara Guida, Noelle Lachaussée, Matias Simons.
- Writing original draft: Sara Gonçalves, Maria Clara Guida, Rolf Bodmer, Corinne Antignac, Matias Simons.
- Writing review & editing: Sara Gonçalves, Maria Clara Guida, Noelle Lachaussée, Christelle Arrondel, Martin Helmstädter, Olivia Boyer, Olivier Gribouval, Marie-Claire Gubler, Geraldine Mollet, Marlène Rio, Marina Charbit, Christine Bole-Feysot, Patrick Nitschke, Tobias B. Huber, Patricia G. Wheeler, Devon Haynes, Jane Juusola, Thierry Billette de Villemeur, Caroline Nava, Alexandra Afenjar, Boris Keren, Rolf Bodmer, Corinne Antignac, Matias Simons.

References

- Posey JE, Harel T, Liu P, Rosenfeld JA, James RA, Coban Akdemir ZH, et al. Resolution of Disease Phenotypes Resulting from Multilocus Genomic Variation. The New England journal of medicine. 2017; 376(1):21–31. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1516767 PMID: 27959697; PubMed Central PMCID: PMCPMC5335876.
- Margolin DH, Kousi M, Chan YM, Lim ET, Schmahmann JD, Hadjivassiliou M, et al. Ataxia, dementia, and hypogonadotropism caused by disordered ubiquitination. The New England journal of medicine. 2013; 368(21):1992–2003. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1215993 PMID: 23656588; PubMed Central PMCID: PMCPMC3738065.
- Kajiwara K, Berson EL, Dryja TP. Digenic retinitis pigmentosa due to mutations at the unlinked peripherin/RDS and ROM1 loci. Science. 1994; 264(5165):1604–8. PMID: 8202715.
- Lemmers RJ, Tawil R, Petek LM, Balog J, Block GJ, Santen GW, et al. Digenic inheritance of an SMCHD1 mutation and an FSHD-permissive D4Z4 allele causes facioscapulohumeral muscular dystrophy type 2. Nat Genet. 2012; 44(12):1370–4. <u>https://doi.org/10.1038/ng.2454</u> PMID: <u>23143600</u>; PubMed Central PMCID: PMCPMC3671095.
- Katsanis N. The oligogenic properties of Bardet-Biedl syndrome. Hum Mol Genet. 2004; 13 Spec No 1: R65–71. https://doi.org/10.1093/hmg/ddh092 PMID: 14976158.
- Schaffer AA. Digenic inheritance in medical genetics. Journal of medical genetics. 2013; 50(10):641– 52. https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2013-101713 PMID: 23785127; PubMed Central PMCID: PMCPMC3778050.
- Kruer MC, Jepperson T, Dutta S, Steiner RD, Cottenie E, Sanford L, et al. Mutations in gamma adducin are associated with inherited cerebral palsy. Ann Neurol. 2013; 74(6):805–14. https://doi.org/10.1002/ ana.23971 PMID: 23836506; PubMed Central PMCID: PMCPMC3952628.
- Hildebrandt F. Genetic kidney diseases. Lancet. 2010; 375(9722):1287–95. https://doi.org/10.1016/ S0140-6736(10)60236-X PMID: 20382325; PubMed Central PMCID: PMC2898711.
- Matsuoka Y, Li X, Bennett V. Adducin: structure, function and regulation. Cellular and molecular life sciences: CMLS. 2000; 57(6):884–95. https://doi.org/10.1007/PL00000731 PMID: 10950304.
- Li X, Matsuoka Y, Bennett V. Adducin preferentially recruits spectrin to the fast growing ends of actin filaments in a complex requiring the MARCKS-related domain and a newly defined oligomerization domain. J Biol Chem. 1998; 273(30):19329–38. PMID: 9668123.
- Puri PL, Sartorelli V, Yang XJ, Hamamori Y, Ogryzko VV, Howard BH, et al. Differential roles of p300 and PCAF acetyltransferases in muscle differentiation. Mol Cell. 1997; 1(1):35–45. PMID: 9659901.
- Martinez-Balbas MA, Bauer UM, Nielsen SJ, Brehm A, Kouzarides T. Regulation of E2F1 activity by acetylation. The EMBO journal. 2000; 19(4):662–71. https://doi.org/10.1093/emboj/19.4.662 PMID: 10675335; PubMed Central PMCID: PMCPMC305604.
- Liu L, Scolnick DM, Trievel RC, Zhang HB, Marmorstein R, Halazonetis TD, et al. p53 sites acetylated in vitro by PCAF and p300 are acetylated in vivo in response to DNA damage. Molecular and cellular biology. 1999; 19(2):1202–9. PMID: 9891054; PubMed Central PMCID: PMCPMC116049.
- Xu W, Edmondson DG, Roth SY. Mammalian GCN5 and P/CAF acetyltransferases have homologous amino-terminal domains important for recognition of nucleosomal substrates. Molecular and cellular biology. 1998; 18(10):5659–69. PMID: 9742083; PubMed Central PMCID: PMCPMC109152.
- Ohler S, Hakeda-Suzuki S, Suzuki T. Hts, the Drosophila homologue of Adducin, physically interacts with the transmembrane receptor Golden goal to guide photoreceptor axons. Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists. 2011; 240(1):135–48. https://doi.org/ 10.1002/dvdy.22515 PMID: 21128303.
- Carre C, Szymczak D, Pidoux J, Antoniewski C. The histone H3 acetylase dGcn5 is a key player in Drosophila melanogaster metamorphosis. Molecular and cellular biology. 2005; 25(18):8228–38. https:// doi.org/10.1128/MCB.25.18.8228-8238.2005 PMID: 16135811; PubMed Central PMCID: PMCPMC1234334.
- Diop SB, Bodmer R. Gaining Insights into Diabetic Cardiomyopathy from Drosophila. Trends in endocrinology and metabolism: TEM. 2015; 26(11):618–27. https://doi.org/10.1016/j.tem.2015.09.009 PMID: 26482877; PubMed Central PMCID: PMCPMC4638170.
- Bodmer R, Frasch M. Development and Aging of the Drosophila Heart. Rosenthal N, Harvey R, editors: Amsterdam: Elsevier; 2010. 47–86 p.
- Weavers H, Prieto-Sanchez S, Grawe F, Garcia-Lopez A, Artero R, Wilsch-Brauninger M, et al. The insect nephrocyte is a podocyte-like cell with a filtration slit diaphragm. Nature. 2009; 457(7227):322–6. https://doi.org/10.1038/nature07526 PMID: 18971929; PubMed Central PMCID: PMC2687078.
- 20. Zhuang S, Shao H, Guo F, Trimble R, Pearce E, Abmayr SM. Sns and Kirre, the Drosophila orthologs of Nephrin and Neph1, direct adhesion, fusion and formation of a slit diaphragm-like structure in insect

nephrocytes. Development. 2009; 136(14):2335–44. https://doi.org/10.1242/dev.031609 PMID: 19515699; PubMed Central PMCID: PMC2729346.

- Helmstadter M, Simons M. Using Drosophila nephrocytes in genetic kidney disease. Cell Tissue Res. 2017; 369(1):119–26. https://doi.org/10.1007/s00441-017-2606-z PMID: 28401308.
- Lovric S, Goncalves S, Gee HY, Oskouian B, Srinivas H, Choi WI, et al. Mutations in sphingosine-1phosphate lyase cause nephrosis with ichthyosis and adrenal insufficiency. J Clin Invest. 2017; 127 (3):912–28. https://doi.org/10.1172/JCI89626 PMID: 28165339; PubMed Central PMCID: PMCPMC5330730.
- 23. Hermle T, Braun DA, Helmstadter M, Huber TB, Hildebrandt F. Modeling Monogenic Human Nephrotic Syndrome in the Drosophila Garland Cell Nephrocyte. J Am Soc Nephrol. 2017; 28(5):1521–33. https://doi.org/10.1681/ASN.2016050517 PMID: 27932481; PubMed Central PMCID: PMCPMC5407722.
- Helmstadter M, Luthy K, Godel M, Simons M, Ashish, Nihalani D, et al. Functional study of mammalian Neph proteins in Drosophila melanogaster. PLoS One. 2012; 7(7):e40300. https://doi.org/10.1371/ journal.pone.0040300 PMID: 22792268; PubMed Central PMCID: PMC3391254.
- Grahammer F, Wigge C, Schell C, Kretz O, Patrakka J, Schneider S, et al. A flexible, multilayered protein scaffold maintains the slit in between glomerular podocytes. JCI Insight. 2016; 1(9). https://doi.org/ 10.1172/jci.insight.86177 PMID: 27430022; PubMed Central PMCID: PMCPMC4943462.
- Ivy JR, Drechsler M, Catterson JH, Bodmer R, Ocorr K, Paululat A, et al. Klf15 Is Critical for the Development and Differentiation of Drosophila Nephrocytes. PLoS One. 2015; 10(8):e0134620. https://doi. org/10.1371/journal.pone.0134620 PMID: 26301956; PubMed Central PMCID: PMCPMC4547745.
- Na J, Sweetwyne MT, Park AS, Susztak K, Cagan RL. Diet-Induced Podocyte Dysfunction in Drosophila and Mammals. Cell reports. 2015; 12(4):636–47. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.06.056 PMID: 26190114; PubMed Central PMCID: PMCPMC4532696.
- Kruzel-Davila E, Shemer R, Ofir A, Bavli-Kertselli I, Darlyuk-Saadon I, Oren-Giladi P, et al. APOL1-Mediated Cell Injury Involves Disruption of Conserved Trafficking Processes. J Am Soc Nephrol. 2017; 28(4):1117–30. https://doi.org/10.1681/ASN.2016050546 PMID: 27864431; PubMed Central PMCID: PMCPMC5373454.
- Gee HY, Sadowski CE, Aggarwal PK, Porath JD, Yakulov TA, Schueler M, et al. FAT1 mutations cause a glomerulotubular nephropathy. Nature communications. 2016; 7:10822. https://doi.org/10.1038/ ncomms10822 PMID: 26905694; PubMed Central PMCID: PMCPMC4770090.
- Gee HY, Zhang F, Ashraf S, Kohl S, Sadowski CE, Vega-Warner V, et al. KANK deficiency leads to podocyte dysfunction and nephrotic syndrome. J Clin Invest. 2015; 125(6):2375–84. https://doi.org/10. 1172/JCI79504 PMID: 25961457; PubMed Central PMCID: PMCPMC4497755.
- Xu W, Edmondson DG, Evrard YA, Wakamiya M, Behringer RR, Roth SY. Loss of Gcn5l2 leads to increased apoptosis and mesodermal defects during mouse development. Nat Genet. 2000; 26 (2):229–32. https://doi.org/10.1038/79973 PMID: 11017084.
- Yu H, Artomov M, Brahler S, Stander MC, Shamsan G, Sampson MG, et al. A role for genetic susceptibility in sporadic focal segmental glomerulosclerosis. J Clin Invest. 2016; 126(3):1067–78. <u>https://doi.org/10.1172/JCI82592</u> PMID: 26901816; PubMed Central PMCID: PMCPMC4767358.
- Boerries M, Grahammer F, Eiselein S, Buck M, Meyer C, Goedel M, et al. Molecular fingerprinting of the podocyte reveals novel gene and protein regulatory networks. Kidney international. 2013; 83(6):1052– 64. https://doi.org/10.1038/ki.2012.487 PMID: 23364521.
- Puttagunta R, Tedeschi A, Soria MG, Hervera A, Lindner R, Rathore KI, et al. PCAF-dependent epigenetic changes promote axonal regeneration in the central nervous system. Nat Commun. 2014; 5:3527. https://doi.org/10.1038/ncomms4527 PMID: 24686445.
- Park SY, Kim MJ, Kim YJ, Lee YH, Bae D, Kim S, et al. Selective PCAF inhibitor ameliorates cognitive and behavioral deficits by suppressing NF-kappaB-mediated neuroinflammation induced by Abeta in a model of Alzheimer's disease. Int J Mol Med. 2015; 35(4):1109–18. <u>https://doi.org/10.3892/ijmm.2015</u>. 2099 PMID: 25672970.
- 36. Rabhi N, Denechaud PD, Gromada X, Hannou SA, Zhang H, Rashid T, et al. KAT2B Is Required for Pancreatic Beta Cell Adaptation to Metabolic Stress by Controlling the Unfolded Protein Response. Cell Rep. 2016; 15(5):1051–61. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.03.079 PMID: 27117420.
- Bastiaansen AJ, Ewing MM, de Boer HC, van der Pouw Kraan TC, de Vries MR, Peters EA, et al. Lysine acetyltransferase PCAF is a key regulator of arteriogenesis. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2013; 33 (8):1902–10. https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.113.301579 PMID: 23788761; PubMed Central PMCID: PMCPMC4049097.
- Jeitany M, Bakhos-Douaihy D, Silvestre DC, Pineda JR, Ugolin N, Moussa A, et al. Opposite effects of GCN5 and PCAF knockdowns on the alternative mechanism of telomere maintenance. Oncotarget. 2017; 8(16):26269–80. https://doi.org/10.18632/oncotarget.15447 PMID: 28412741; PubMed Central PMCID: PMCPMC5432255.

- Ghosh TK, Aparicio-Sanchez JJ, Buxton S, Ketley A, Mohamed T, Rutland CS, et al. Acetylation of TBX5 by KAT2B and KAT2A regulates heart and limb development. J Mol Cell Cardiol. 2018; 114:185– 98. https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2017.11.013 PMID: 29174768.
- Fournier M, Orpinell M, Grauffel C, Scheer E, Garnier JM, Ye T, et al. KAT2A/KAT2B-targeted acetylome reveals a role for PLK4 acetylation in preventing centrosome amplification. Nature communications. 2016; 7:13227. https://doi.org/10.1038/ncomms13227 PMID: 27796307; PubMed Central PMCID: PMCPMC5095585.
- Field MA, Cho V, Andrews TD, Goodnow CC. Reliably Detecting Clinically Important Variants Requires Both Combined Variant Calls and Optimized Filtering Strategies. PLoS One. 2015; 10(11):e0143199. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143199 PMID: 26600436; PubMed Central PMCID: PMCPMC4658170.
- Delous M, Hellman NE, Gaude HM, Silbermann F, Le Bivic A, Salomon R, et al. Nephrocystin-1 and nephrocystin-4 are required for epithelial morphogenesis and associate with PALS1/PATJ and Par6. Hum Mol Genet. 2009; 18(24):4711–23. https://doi.org/10.1093/hmg/ddp434 PMID: <u>19755384</u>; PubMed Central PMCID: PMCPMC2778369.
- Abmayr SM, Yao T, Parmely T, Workman JL. Preparation of nuclear and cytoplasmic extracts from mammalian cells. Curr Protoc Mol Biol. 2006;Chapter 12:Unit 12 1. <u>https://doi.org/10.1002/</u> 0471142727.mb1201s75 PMID: 18265374.
- 44. Sobreira N, Schiettecatte F, Valle D, Hamosh A. GeneMatcher: a matching tool for connecting investigators with an interest in the same gene. Hum Mutat. 2015; 36(10):928–30. https://doi.org/10.1002/ humu.22844 PMID: 26220891; PubMed Central PMCID: PMCPMC4833888.
- Ganetzky B, Flanagan JR. On the relationship between senescence and age-related changes in two wild-type strains of Drosophila melanogaster. Exp Gerontol. 1978; 13(3–4):189–96. PMID: 99324.
- Ocorr K, Fink M, Cammarato A, Bernstein S, Bodmer R. Semi-automated Optical Heartbeat Analysis of small hearts. J Vis Exp. 2009;(31). <u>https://doi.org/10.3791/1435</u> PMID: <u>19759521</u>; PubMed Central PMCID: PMCPMC3150057.



ARTICLE

https://doi.org/10.1038/s41467-019-11951-x

OPEN

Defects in t⁶A tRNA modification due to GON7 and YRDC mutations lead to Galloway-Mowat syndrome

Christelle Arrondel et al.#

N⁶-threonyl-carbamoylation of adenosine 37 of ANN-type tRNAs (t⁶A) is a universal modification essential for translational accuracy and efficiency. The t⁶A pathway uses two sequentially acting enzymes, YRDC and OSGEP, the latter being a subunit of the multiprotein KEOPS complex. We recently identified mutations in genes encoding four out of the five KEOPS subunits in children with Galloway-Mowat syndrome (GAMOS), a clinically heterogeneous autosomal recessive disease characterized by early-onset steroid-resistant nephrotic syndrome and microcephaly. Here we show that mutations in *YRDC* cause an extremely severe form of GAMOS whereas mutations in *GON7*, encoding the fifth KEOPS subunit, lead to a milder form of the disease. The crystal structure of the GON7/LAGE3/ OSGEP subcomplex shows that the intrinsically disordered GON7 protein becomes partially structured upon binding to LAGE3. The structure and cellular characterization of GON7 suggest its involvement in the cellular stability and quaternary arrangement of the KEOPS complex.

Correspondence and requests for materials should be addressed to H.T. (email: herman.van-tilbeurgh@i2bc.paris-saclay.fr) or to G.M. (email: geraldine.mollet@inserm.fr). #A full list of authors and their affiliations appears at the end of the paper.
ransfer RNAs (tRNA) are subject to multiple posttranscriptional modifications that are important for the stabilization of their ternary structure and the precision of the decoding process¹. The majority of the complex modifications are concentrated in the anticodon region of the tRNAs and are crucial for accuracy of protein synthesis. The threonylcarbamoylation of the N⁶ nitrogen of the adenosine at position 37 (t⁶A) of most ANN-accepting tRNAs represents one of the very few nucleotide modifications that exists in every domain of life^{2,3}. The t⁶A biosynthesis pathway consists of two steps: firstly, the YRDC enzyme (Sua5 in yeast) synthesizes an unstable threonylcarbamoyl-AMP intermediate (TC-AMP) and in a second step, the KEOPS protein complex transfers the TC-moiety from TC-AMP onto the tRNA substrate⁴. Enzymes that synthesize TC-AMP exist in two versions depending on the organism: a short form which only has the YrdC domain (such as human YRDC) and a long form which has an extra Sua5 domain (yeast SUA5 for instance). The eukaryotic KEOPS complex contains five subunits GON7/LAGE3/OSGEP/TP53RK/TPRKB that are arranged linearly in that order⁵⁻⁸. OSGEP is the catalytic subunit that carries out the TC-transfer reaction and its orthologs are present in virtually all sequenced genomes⁹. The other subunits are essential for the t⁶A modification of tRNA, but their precise roles are as yet unknown, especially that of GON7, an intrinsically disordered protein (IDP), which was only recently identified in humans^{5,7}. Fungal Gon7 was shown to be an IDP that adopts a well-defined structure covering 50% of its sequence upon complex formation with Pcc1 (LAGE3 homolog)8. In humans, GON7 was recently shown to be also structurally disordered in absence of the other KEOPS complex subunits. GON7 was proposed to be a very remote homolog of the yeast Gon7 protein although its structure upon complex formation remains unknown^{5,7}.

tRNA modifications have been demonstrated to play a role in the development of the brain and nervous system, and an increasing number of defects in these modifications are now being linked to various human neurodevelopmental disorders¹⁰. We recently identified autosomal recessive mutations in genes encoding four of the five subunits of human KEOPS complex, namely LAGE3, OSGEP, TP53RK, and TPRKB in patients with Galloway-Mowat syndrome (GAMOS, OMIM#251300). GAMOS is a rare neuro-renal disorder characterized by the co-occurrence of steroid-resistant nephrotic syndrome (SRNS) with microcephaly and neurological impairment¹¹. GAMOS is clinically heterogeneous, reflecting a genetic heterogeneity. Indeed, diseasecausing mutations have been identified in eight genes to date: four in KEOPS genes and four in other unrelated genes, WDR73, WDR4, NUP133, and NUP107 (refs. 12-17). SRNS is typically detected in the first months of life and most often rapidly progresses to end-stage renal disease (ESRD) within a few months; however, there are rarer cases with preserved renal function in adulthood¹⁸. Kidney lesions range from minimal change disease, to focal segmental glomerulosclerosis (FSGS) that might be of the collapsing type, or diffuse mesangial sclerosis (DMS). Cerebral imaging findings include cerebral and cerebellar atrophy, and gyration and/or myelination defects. These anomalies are associated with neurological deficits such as psychomotor impairment, hypotonia, seizures, and more rarely sensorineural blindness and deafness. Affected children may also present with facial and/or skeletal dysmorphic features. The prognosis of GAMOS is poor, and most affected children die before 6 years of age.

Here we present 14 GAMOS-affected individuals from seven families, with mutations in GON7 (alias C14orf142) and YRDC, both genes encoding proteins involved in the biosynthesis of the $t^{6}A$ modification. These data, together with our previous work, show that mutations in genes encoding all the proteins involved in the two chemical steps of $t^{6}A$ lead to GAMOS. Furthermore,

we determine the crystal structure of the GON7/LAGE3/OSGEP KEOPS subcomplex showing that GON7 becomes structured upon binding to LAGE3. The structure also explains our observations that GON7 stabilizes the remainder of the KEOPS complex and directs its quaternary organization.

Results

Identification of GON7 and YRDC mutations in GAMOS patients. Through whole-exome sequencing in individuals with GAMOS, we identified mutations in the GON7 gene in 11 affected individuals from 5 unrelated families and in the YRDC gene in 3 affected individuals from 2 unrelated families (Fig. 1a-d and Supplementary Table 1). Four of the families with GON7 mutations (Families A to D) carried the same homozygous nonsense mutation (c.21 C>A, p.Tyr7*) which causes a stop codon at position 7 of the protein. These families, all originating from the same region of Algeria, shared a common haplotype at the GON7 locus indicating a founder effect (Supplementary Table 2). The affected individual of the fifth family (Family E) carried a different mutation involving the same residue at position 7 and leading to a frameshift (c.19dup, p.Tyr7Leufs*16). Both GON7 mutations are predicted to lead to the absence of protein expression and, as expected, no protein was detected in cells available from the affected individuals from family A, B, and C (Supplementary Fig. 1a, c). Two compound heterozygous YRDC mutations were identified in Family F: a missense mutation (c.251 C>T, p.Ala84Val) and a 4-base pair deletion leading to a frameshift (c.721_724del, p.Val241Ilefs*72). In Family G, we identified a homozygous in-frame deletion of Leucine 265 (c.794 796 del, p.Leu265del). For both families, western blot and qPCR analysis on cell extracts from affected children showed the presence of YRDC transcripts and proteins (Supplementary Fig. 1b, d). To make a prediction of the effect of the YRDC mutations on the protein, we created a three-dimensional (3D) structural model of human YRDC using the structure of the YRDC domain of the archaeal Sua5 (PDB 4E1B, 20% sequence identity¹⁹) and mapped these mutations onto this in silico model (Fig. 1e). Structures of YRDC domains are very well conserved and sequence alignment shows that the human YRDC only has minor insertions/deletions compared to Sua5 (Supplementary Fig. 2). The replacement of Ala84, located in a hydrophobic region between a β -sheet and a connecting a-helix, by the larger amino acid valine might perturb optimal packing and destabilize the structure of the protein. The YRDC Leu265del mutation affects a highly conserved amino acid and creates a deletion in a C-terminal peptide that hangs over the active site and could have a role in enzyme activity.

Early-onset proteinuria was observed in all affected children, with first detection ranging from between birth and 5 years. All but three children reached ESRD between 1.5 months and 6 years of age. All individuals carrying YRDC mutations presented with congenital or infantile SRNS detected from between birth and 4 months of age and died early, whereas most of the individuals carrying GON7 mutations were alive at last follow-up, with either a functioning graft or with normal renal function despite a mild to heavy proteinuria (Supplementary Table 1). Kidney biopsies, when available, typically displayed FSGS (Families A, C, and E) or DMS (Families B, F, and G) (Fig. 2a-d). In addition to developmental delay, primary microcephaly was present in the two affected children of one family with YRDC mutations, whereas the affected child in the second YRDC family and all GON7-mutated individuals presented with post-natal microcephaly. Brain magnetic resonance imaging revealed a spectrum of cerebellar and cortical hypoplasia or atrophy with thin corpus callosum and ventricular dilation, myelination delay, and in one case a simplified gyral pattern (Individual G.II-2) (Fig. 2e-n,

ARTICLE



Fig. 1 Identification of mutations in *GON7* and *YRDC* in patients with Galloway-Mowat syndrome. **a**, **c** Pedigrees of families with mutations in *GON7* (**a**) and in *YRDC* (**c**). Affected individuals are in black. **b**, **d** Organization of exons of human *GON7* and *YRDC* cDNAs. Positions of start and stop codons are indicated. Arrows indicate positions of the identified mutations. Lower panels show the sequencing traces for affected individuals with identified mutated nucleotide indicated with a red square (Hom: homozygous; het, heterozygous). **e** Representation of a 3D model of human YRDC, bound to the reaction product threonylcarbamoyl-adenylate, in sticks. The model was constructed using the crystal structure of *Sulfolobus tokodaii* Sua5 (PDB code 4E1B). The side chains of the three mutated residues are in black sticks. The green sphere represents an Mg²⁺ ion

Supplementary Fig. 3). Extra-renal features included facial dysmorphy, arachnodactyly, hiatal hernia with gastroesophageal reflux, congenital hypothyroidism (solely in the *YRDC* cases), and myoclonia. This clinical picture is highly reminiscent of that observed in GAMOS-affected individuals with mutations in *LAGE3*, *OSGEP*, *TP53RK*, and *TPRKB*¹³. However, individuals with *GON7* mutations presented with milder neurological and renal manifestations, always with post-natal microcephaly and no gyration defects, later onset of proteinuria (median age 18 months vs. 1) and slower progression to ESRD



Fig. 2 Kidney pathology analysis and neuroimaging. Light and transmission electron microscopy (TEM) of kidney sections of patients with *GON7* (**a**, **b**) or *YRDC* mutations (**c**, **d**). **a** Individual A.II-3 displays a retracted glomerulus with a focal segmental glomerulosclerosis lesion at the vascular pole (black arrow) and tubular dilations (black star) (PAS; ×200 magnification). **b** Individual B.II-4 displays diffuse mesangial sclerosis with tiny, retracted and sclerosed glomeruli (black arrow) with dilated tubes surrounded by flat epithelial cells (black star) and interstitial fibrosis (H&E; ×400 magnification). **c** Individual F.II-1 displays a marked glomerular tuft collapsing (arrowhead) surrounded by a layer of enlarged and vacuolized podocytes (black arrows) (PAS stain; ×400 magnification, scale bar, 10 μm). **d** TEM of individual G.II-1 shows diffuse foot process effacement (FPE; black arrow), a classical hallmark of nephrotic syndrome, along a glomerular basement membrane (GBM) with abnormal folded and laminated segments (yellow stars), alternating with others with normal appearance. P podocyte, RBC red blood cell. Scale bar, 2 μm. Brain MRI of patients with *GON7* (**e**, **f**) and *YRDC* mutations (**i-n**). **e**, **f** Brain MRI abnormalities in individual B.II-4 at 5 years. Sagittal T1-weighted image (**e**) shows abnormal myelination and ventricular dilatation (red arrow). **g**, **h** Brain MRI of a 5-year old control showing sagittal T1 (**g**) and axial T2 (**h**) weighted images. **i-l** Brain MRI abnormalities in individual F.II-1 at 5 months (**i**, **j**) and 11 months (**k**, **l**). Sagittal T2-weighted image shows normal pattern at 5 months (**i**) evolving to a progressive major cerebellar (arrowhead) and cortical atrophy with a very thin corpus callosum (arrow) at 11 months (**k**). The axial T2-weighted image is normal at 5 months (**j**) but shows a very marked abnormality of myelination and cortical atrophy (red arrow) at 11 months (**l**). **m**, **n** Brain MRI abnormalities in individual G.II-2 at 1 month. Sagittal

(median age 49 months in 8/11 children vs. 5 months in 3/3 children), and a longer survival compared to the *YRDC* cases.

Impact of YRDC and GON7 mutations on t⁶A biosynthesis. To assess the pathogenicity of YRDC mutations, we first used a yeast heterologous expression and complementation assay as previously performed for OSGEP mutations identified in GAMOS individuals¹³. Indeed, the deletion of SUA5, the YRDC ortholog in *S. cerevisiae* leads to a very severe growth defect, similarly to the deletion of each of the genes encoding the five KEOPS subunits^{3,6,20,21}. We therefore heterologously expressed the human YRDC cDNAs encoding wild-type (WT) and mutant proteins in the *Asua5* strain to evaluate their ability to rescue the slow growth phenotype. Since the catalytic activity of YRDC does not require protein partners, the WT YRDC protein efficiently complemented the *Asua5* growth defect (Fig. 3a). Although a somewhat similar complementation was observed for the p. Ala84Val and p.Leu265del mutants, the p.Val241Ilefs*72 mutant was notably unable to improve the poor growth of the $\Delta sua5$ strain (Fig. 3a). All YRDC proteins were efficiently expressed in $\Delta sua5$ strain, except the p.Val241Ilefs*72 mutant that was barely detectable by western blot, suggesting that it is likely being degraded by an intracellular proteolytic machinery (Fig. 3b). Using mass spectrometry, we then analyzed the t⁶A content of these transformed $\Delta sua5$ yeast strains. As expected, since Sua5 is the only enzyme in yeast that generates TC-AMP, the $\Delta sua5$ mutant was unable to synthetize t⁶A, whereas the WT YRDC expressing strain exhibited t⁶A levels comparable with those measured for WT Sua5 (Fig. 3c). The p.Ala84Val and p.Leu265del mutants showed a slight, but significant decrease in t⁶A levels. In contrast, like in the $\Delta sua5$ strain, no trace of t⁶A modification could be detected in the p.Val241Ilefs*72 mutant (Fig. 3c). In line with the results of the growth complementation assay, there was a



Fig. 3 Effects of *YRDC* and *GON7* mutations on t⁶A biosynthesis. **a** Evaluation of fitness of $\Delta sua5$ yeast strains expressing human YRDC variants (spots are from 10-fold serial dilutions of cell suspensions at OD_{600nm} = 0.5, and three independent clones were evaluated) and **b** western blot analysis on total protein extracts from $\Delta sua5$ yeast cells expressing human YRDC variants using anti-hYRDC antibody. **c**, **d** Mass spectrometry (LC-MS/MS) quantification of t⁶A modification in total tRNAs extracted from $\Delta sua5$ yeast cells expressing human YRDC variants (**c**) (mean ± s.e.m. of two independent LC-MS/MS experiments (technical replicates), each measuring samples from three independent yeast transformants; one-way ANOVA (*F* (5,28) = 269.4, *p* < 0.0001), Dunnett's multiple comparisons test, ****p* = 0.0008, *****p* < 0.0001) and from cultured primary skin fibroblasts from controls (two unaffected individuals) or with the p. Tyr7* *GON7* mutation (two individuals), or the YRDC mutations (three individuals) or with the p. Arg352Gln *OSGEP* mutation in the homozygous state (individual «CP» described in Braun et al.¹³) (**d**) (mean ± s.e.m. of two independent LC-MS/MS experiments (technical replicates), each measuring samples from three independent cell culture experiments; one-way ANOVA (*F* (3,44) = 6.446, *p* < 0.001), Dunnett's multiple comparisons test, n.s. = 0.4894, **p* = 0.0169, ****p* = 0.008). Source data are provided as a Source Data file

direct correlation between cell fitness and t⁶A content. This allowed us to classify YRDC mutations into hypomorphic (encoding p.Ala84Val and p.Leu265del) and amorphic (encoding p.Val241Ilefs*72) alleles, as has been previously shown for OSGEP mutations¹³. A similar approach could not be applied for GON7 mutations since GON7 failed to complement the growth defect of the $\Delta gon7$ yeast strain (see ref. ⁷ and our data). We therefore measured the t⁶A content in fibroblasts from two individuals with the p.Tyr7* GON7 mutation, three individuals with YRDC mutations and one individual with the p.Arg325Gln OSGEP mutation. The t⁶A levels were significantly decreased in both YRDC- and OSGEP-mutated fibroblasts, and to a lesser extent in GON7-mutated fibroblasts (Fig. 3d) confirming the impact of these mutations on t⁶A biosynthesis in affected individuals. In addition, we demonstrated that, similarly to individuals with OSGEP or TP53RK mutations¹³, telomere length was not affected in individuals with YRDC and GON7 mutations (Supplementary Fig. 4). This confirms that contrary to what has been demonstrated in yeast, human YRDC, and KEOPS complex are not involved in telomere maintenance in human cells²²⁻²⁴.

In vitro characterization of WT and mutants YRDC. To compare the stability and structure of the WT YRDC with those of the p.Ala84Val and p.Leu265del mutants, we expressed and

purified these proteins in an E. coli expression system (Supplementary Table 3). The three proteins could be purified but we noticed that both mutants were less stable and less soluble compared to the WT (Supplementary Methods). To probe the proper folding of the YRDC WT and mutants, we collect 1D ¹H-NMR spectra (Supplementary Fig. 5a). All the spectra displayed well-dispersed signals for amide protons as well as several signals at chemical shifts lower than 0.8 ppm that are typical of methyl groups in the hydrophobic core of proteins, suggesting the WT and mutants were well folded. To compare their enzymatic properties, we measured their TC-AMP synthesizing activities in vitro by quantifying the pyrophosphate reaction product. The p.Ala84Val and p.Leu265del mutants have lost about 75% and 30% of their activities respectively compared to WT (Supplementary Fig. 5b). The activities of these mutants are compatible with their hypomorphic nature, as suggested by the results of the yeast $\Delta sua5$ complementation experiments (Fig. 3a).

Proliferation, apoptosis, and protein synthesis defects. We have previously shown that transient gene expression knockdown (KD) of human KEOPS components *OSGEP*, *TP53RK*, and *TPRKB* leads to perturbations of various cellular processes including proliferation and apoptosis¹³. Similarly here, we transiently depleted the expression of *GON7* and *YRDC*, as well as *LAGE3* and *OSGEP* as



Fig. 4 Proliferation, apoptosis, and protein synthesis defects upon *GON7* and *YRDC* knockdown. Transient knockdown (KD) of *GON7*, *LAGE3*, *YRDC*, and *OSGEP* was performed by lentiviral transduction of shRNA in immortalized human podocyte cell lines with a scrambled (non-targeting) shRNA as control. **a** Cell proliferation was assessed using a colorimetric MTT assay over 7 days, measuring absorbance at 490 nm at days 1, 2, 3, 4, and 7 (mean ± s.e.m. of n = 5 experiments, with each experiment performed in triplicate; two-way ANOVA (p < 0.0001), Dunnett's multiple comparisons test, n.s. = 0.2031, ***p < 0.0007, ****p < 0.0001). **b** Cell apoptosis was evaluated by quantification of caspase 3/7 activation on the basis of fluorescence intensity (530/405 nm). Absolute values were normalized to DAPI fluorescence intensity as an internal control and compared to non-targeting shRNA-treated control cells (scrambled) (mean ± s.e.m. of n = 3 experiments with each experiment performed in triplicate; one-way ANOVA (F (4,10) = 21.42, p < 0.0001), Dunnett's multiple comparisons test, n.s. = 0.0556, **p = 0.0012, ****p < 0.0001). **c** Protein biosynthesis rates were assessed on the basis of incorporation of HPG, an alkyne-containing methionine analog. After 2 h, alkyne-containing proteins were quantified on the basis of fluorescence intensity (485/535 nm). Absolute values were normalized to DAPI fluorescence intensity as an internal control and compared to control cells (mean ± s.e.m. of n = 3 experiments, with each experiment control and compared to control cells (mean ± s.e.m. of n = 3 experiments, with each experiment control and compared to control cells (mean ± s.e.m. of n = 3 experiments, with each experiment performed in triplicate, one-way ANOVA (F (4,10) = 16.36, p = 0.0002), Dunnett's multiple comparisons test, **p = 0.0035, ****p < 0.0003. **d** Relative expression of *GON7*, *YRDC*, *LAGE3*, and *OSGEP* transcripts were normalized to that of HPRT in KD podocytes compared to non-tar

positive controls, in an immortalized human podocyte cell line²⁵. We then demonstrated using a colorimetric cell proliferation assay that diminished expression of all four of these genes decreased cell proliferation, with the strongest decrease being observed in LAGE3 KD podocytes (Fig. 4a). Despite efficient GON7 KD, cells exhibited only a slight decrease in cell proliferation compared to cells treated with the control scrambled shRNA (Fig. 4a, d). The impairment of cell proliferation in YRDC and OSGEP KD cells was less marked than in LAGE3 KD cells, which could be explained by a less efficient gene silencing (Fig. 4d). By measuring Caspase-3/7 activity, we next demonstrated that apoptosis was inversely related to proliferation with LAGE3 KD podocytes displaying the highest rate of apoptosis (Fig. 4b). Since loss of t⁶A modification impacts global translation in yeast²⁶, we also quantified the newly synthetized protein levels, which were decreased in all KD cells (Fig. 4c), even in GON7 KD podocytes where proliferation and apoptosis rates were not drastically affected (Fig. 4a, b). Altogether, these results reinforce our previous findings for the other KEOPS subunits, OSGEP, TP53RK, and TPRBK, and confirm that mutations which alter t⁶A biosynthesis in human cells have an impact on cell survival through decreased proliferation and protein synthesis, ultimately leading to apoptosis.

Structure of the human GON7/LAGE3/OSGEP subcomplex. To better understand the role of human GON7 and how its loss of

function could be connected with GAMOS, we set out to determine its structure and to establish how it interacts with the other KEOPS subunits. We had either crystal structures (TPRKB) or good quality 3D models (LAGE3, OSGEP, TP53RK) for all of the KEOPS subunits at our disposal, except for GON7 (ref.⁶). Based on very weak sequence similarity, it was proposed, that GON7 is a remote homolog of yeast Gon7 (ref. 7). We first investigated the structure of GON7 in solution by collecting a 2D 1H-15N Band-Selective Optimized Flip Angle Short Transient Heteronuclear Multiple-Quantum Correlation (SOFAST-HMQC) NMR spectrum of a ¹⁵N-labeled GON7 sample. The poor spectral dispersion in the ¹H dimension of the 2D correlation spectrum showed that GON7 lacks well-defined structure, confirming the conclusions of Wan et al.⁷. Adding non-labeled LAGE3 to the sample, caused the shift and/or disappearance for many crosspeaks, suggesting GON7 interacts with LAGE3 (Supplementary Fig. 6a). We further characterized the conformation of GON7 in solution by small-angle X-ray scattering (SAXS) measurements. By representing the scattering data as a dimensionless Kratky plot $(qR_g^2 \times I_q/I_0$ versus qR_g), one can assess qualitative information on the degree of compactness of the scattering object²⁷. The plateau observed for GON7 is characteristic of a fully disordered protein, possibly with very short elements of secondary structure (Fig. 5a), confirming our NMR data (Supplementary Fig. 6a). We then purified the recombinant GON7/LAGE3/OSGEP complex and analyzed its behavior in solution by SAXS. Our SAXS data



Fig. 5 Structure of the GON7/LAGE3/OSGEP complex. **a** Normalized Kratky plot of intensity scattering of GON7 (orange) and of the GON7/LAGE3 (green) and GON7/LAGE3/OSGEP complexes (red). *q*: scattering vector, R_g radius of gyration, I_q : scattering intensity, I_0 : scattering intensity at zero angle. **b** Experimental x-ray scattering curve of the GON7/LAGE3/OSGEP complex (red). The blue curve represents the calculated scattering curve for the corresponding crystal structure of the complex. This yielded a good fit with the experimental data ($\chi^2 = 0.33$). The inset shows the BUNCH model. **c** Representation of the crystal structure of the GON7/LAGE3/OSGEP complex: GON7 (gold), LAGE3 (blue), OSGEP (red). The N and C-termini of GON7 are labeled. The crystal lacked density for GON7 beyond residue 50. The active site of OSGEP is highlighted by the Mg²⁺ ion (green). **d** Superimposition of the yeast Gon7/Pcc1 complex (gray) onto GON7/LAGE3/OSGEP. GON7/LAGE3/OSGEP (same color code as in panel **c**)

established that the complex has a 1:1:1 stoichiometry in solution (Fig. 5b, Supplementary Table 4). In contrast with GON7, the dimensionless Kratky plot for GON7/LAGE3/OSGEP shows a bell-shaped curve with a maximum for $qR_g \approx 2$ (Fig. 5a). This shape suggests that the complex is mainly compact, but that disordered regions are still present. In addition, the comparison of the distance distribution functions of GON7/LAGE3/OSGEP and GON7 shows that the latter alone is more extended than the complex (Supplementary Fig. 6b). In full agreement, the ¹⁵N SOFAST-HMQC NMR spectrum of the complex reveals that about 35 amino-acid residues of GON7 remains flexible and disordered in the complex whereas ~35 crosspeaks vanished upon complex formation. These latter crosspeaks likely correspond to amino-acid residues engaged in the interaction with LAGE3 and thus experiencing extensive line-broadening due to the large molecular size of the complex. We therefore deduced that GON7 is becoming partially ordered upon complex formation with LAGE3/OSGEP and set out to determine its structure by X-ray crystallography. We obtained 1.9 Å resolution diffraction data of the GON7/LAGE3/OSGEP complex (Fig. 5c, d, Supplementary Table 5). The structure could be solved by molecular replacement using our 3D models of OSGEP and LAGE3 (refs. 8,13,23). LAGE3 contains 60 residues at the N-terminus that are absent in the Pcc1 orthologs from yeast and archaea and that are predicted to be disordered. We did not observe any electron density for this Nterminal peptide, confirming this region indeed lacks a stable structure. We cannot exclude however that partial proteolysis removed this peptide during the long crystallization process. LAGE3 is at the center of the complex, binding on one side to OSGEP and on the other to GON7, which does not directly

interact with OSGEP (Fig. 5c). The structures of the LAGE3 and OSGEP subunits are very similar to their archaeal/fungal Pcc1 and Kae1 orthologs respectively. The two helices of LAGE3 associate with the N-terminal helices of OSGEP into a helical bundle. Only 45% of the GON7 sequence adopts a well-defined structure upon binding to LAGE3, confirming our SAXS- and NMR-based conclusions (Fig. 5a, Supplementary Fig. 6a-d). The N-terminal peptide of GON7 forms a β-hairpin between Met1 and Ser20 and the region between Gly25 and Pro50 forms a helix that lies parallel against the β -hairpin (Supplementary Fig. 7). Electron density for GON7 was absent for residues 21 to 24 and for the region beyond position 50. The C-terminal half of GON7 is highly enriched in acidic and sparse in hydrophobic amino acids and predicted to be unfolded. Despite their very weak sequence similarity (19% identity, 34% similarity), the structures of human GON7 and yeast Gon7 are almost identical (RMSD = 1.41 Å for 45 Ca positions; yeast Gon7 PDB entry: 4WXA) (Fig. 5d, Supplementary Fig. 7). The β -hairpin of GON7 aligns with the β -sheet of LAGE3 to form a continuous five stranded anti-parallel sheet. The helix of GON7 packs in an anti-parallel orientation against the C-terminal helix of LAGE3. The complex is stabilized mainly by the hydrophobic packing of side chains emanating from β 1 and α 1 of GON7 and α 2 and β 1 of LAGE3. The association mode between GON7 and LAGE3 is very similar to that of the yeast Pcc1/Gon7 complex, illustrated by their superposition (RMSD = 1.4 Å; Fig. 5d). Structure based sequence alignment between human GON7 and yeast Gon7 shows that only 6 out of 45 ordered residues (12%) are conserved (Supplementary Fig. 7). Compared to human GON7, yeast Gon7 is longer by about 20 residues that were disordered in its structure.

The experimental SAXS curve of the GON7/LAGE3/OSGEP complex in solution is in excellent agreement ($\chi^2 = 0.33$) with the scattering curve calculated on the all-atom model built using the program BUNCH from the crystal structure (see Methods) (Fig. 5b). We therefore conclude that, although sharing very low sequence homology, human GON7 and yeast Gon7 are homologs that interact identically with their respective partners (LAGE3, Pcc1) in the human and yeast KEOPS complex.

Role of human GON7 in KEOPS complex stability in vivo. We further explored the deleterious cellular effects of the GAMOSassociated GON7 mutations. We first confirmed by mass spectrometry analysis that in a human podocyte cell line stably overexpressing either 2HA-tagged GON7 or V5-tagged LAGE3, the four additional KEOPS subunits significantly co-purified with GON7 or LAGE3, respectively, thus confirming that a fivesubunit KEOPS complex is present in these renal glomerular cells (Supplementary Fig. 8a). We have previously demonstrated that the majority of GAMOS-associated mutations in genes encoding KEOPS complex components do not affect the intermolecular interactions between the LAGE3/OSGEP/TP53RK/TPRKB subunits¹³. In order to check whether mutations in LAGE3 affected GON7 binding, we co-expressed 2HA-tagged GON7 with WT or mutant V5-tagged LAGE3 in HEK293T cells. Our coimmunoprecipitation experiments demonstrated that the LAGE3 mutations found in GAMOS individuals do not prevent binding to GON7 (Supplementary Fig. 8b). Intriguingly, however, we noticed that co-expression of GON7 with LAGE3 in HEK293T cells led to an increased expression level of GON7, and to a lesser extent of LAGE3, suggesting that the interaction stabilizes both proteins (Fig. 6a). We therefore studied the stability of GON7 and LAGE3 in a time-course experiment using cycloheximide, an inhibitor of protein biosynthesis, in HEK293T cells transiently expressing either 2HA-GON7 or V5-LAGE3 alone or co-expressing both tagged-proteins. When expressed alone, GON7 and LAGE3 protein levels decreased, suggesting both proteins may be unstable in absence of their partner. This is particularly obvious for GON7 whose protein level decreased by half within an hour following cycloheximide addition (Fig. 6b, Supplementary Fig. 9). On the contrary, when co-expressed, we observed an increase of both GON7 and LAGE3 protein levels reflecting an increase in their stability. We wondered whether the absence of GON7 also impacts the stability of the whole KEOPS complex and indeed, we were able to demonstrate that the protein levels of the four KEOPS subunits were decreased in cells of individuals mutated for GON7, whereas they were not affected in cells of individuals with OSGEP or WDR73 mutations, the latter being also responsible for a specific subset of GAMOS cases not linked to a t⁶A biosynthesis defect¹⁵ (Fig. 6c, Supplementary Fig. 10a). In addition, we demonstrated that this protein level decrease was not due to transcriptional regulation (Supplementary Fig. 10b). Altogether, these results suggest that the absence of GON7 affects KEOPS stability resulting in a decreased expression level of the four other subunits, which might impact t⁶A levels.

Discussion

In this study, we identified mutations in two genes encoding proteins involved in t⁶A biosynthesis in GAMOS patients: *YRDC* encoding the enzyme that synthesizes the TC-AMP intermediate used by the KEOPS complex and *GON7* encoding the fifth subunit of the KEOPS complex. Functional analysis of these specific mutations has revealed that they directly impact t⁶A modification (*YRDC*) and/or affect the stability of the KEOPS complex (*GON7*). These results complement our previous findings and establish that mutations in all the genes involved in this pathway lead to GAMOS.

All individuals bearing GON7 or YRDC mutations present with the clinical features of GAMOS, similarly to the individuals previously reported to have mutations in the genes encoding the four other KEOPS subunits. In addition, we have expanded the GAMOS phenotype spectrum by describing congenital hypothyroidism to be associated with YRDC mutations. Although the two GON7 mutations encode truncated non-functional proteins, we noticed that they unexpectedly result in a less severe clinical outcome compared to that of individuals affected by mutations in other KEOPS subunit genes or in YRDC, for which biallelic null mutations were not found. This suggests that the absence of GON7 has less severe consequences for cell life compared to the other components of the t⁶A biosynthesis pathway, where four out of six are encoded by genes considered to be essential²⁸. This less severe clinical outcome correlates with our data showing that GON7 loss of function and depletion in fibroblasts and podocytes, respectively, have globally a weaker effect on t⁶A levels, proliferation, apoptosis, and protein synthesis compared to that of other KEOPS subunits and YRDC mutations or depletion. However, although our data have confirmed that GON7 is a functional homolog of Gon7, the effect of their absence in human and yeast, respectively, is markedly different since in the absence of Gon7, the yeast KEOPS complex has only very low t⁶A activity and cell growth is dramatically affected³. Altogether, our data in humans suggest that GON7 is not as essential in humans as in yeast for t⁶A biosynthesis.

Our biochemical and structural data provide a molecular framework to understand the pathophysiological effects of the GAMOS-associated mutations. The structure of the GON7/ LAGE3/OSGEP complex shows that GON7 is bound exclusively to the non-catalytic LAGE3 subunit, distant from the catalytic center of OSGEP. It has been shown in vitro that the intact human KEOPS complex has a 1:1:1:1:1 stoichiometry, in contrast with the complex lacking GON7 which has a 2:2:2:2 stoichiometry⁷. The latter stoichiometry has also been observed for the archaeal KEOPS complex, for which no fifth subunit similar to Gon7 has yet been discovered. The Pcc1 subunit constitutes the dimerization unit of archaeal KEOPS²⁹ and this is also very likely the case for the LAGE3 subunit of human KEOPS in absence of GON7 (ref.⁷). In line with these results, our structure of the GON7/LAGE3/OSGEP complex shows that GON7 competes with LAGE3 for dimerization, explaining the different stoichiometries of the KEOPS complex observed in the absence or presence of GON7. Indeed, GON7 covers a large hydrophobic surface of LAGE3 (Supplementary Fig. 11), which is very likely occupied by another LAGE3 subunit in the context of a homomeric dimer, as observed in the structure of Pcc1 dimer²⁹. The exposure of this hydrophobic surface due to the absence of GON7 in the GAMOS patients may affect the solubility and activity of the KEOPS complex, and indeed, our data from experiments on cell lines further indicate that GON7 contributes to the stability of the KEOPS complex and/or to the maintenance of the correct (catalytically active) quaternary structure as evidenced by the decrease in KEOPS subunits protein levels observed in GON7 patient cells. Taken together, our data demonstrated that GON7 impacts the stability of the KEOPS complex therefore having an effect on its enzymatic activity. This is in line with the in vitro data of Sicheri's group showing that in presence of GON7, KEOPS t⁶A activity is potentiated²⁹ and with our in vivo data showing that t⁶A levels in GON7-mutated patient fibroblasts are slightly decreased compared to YRDC- and OSGEP-mutated fibroblasts.

Although human GON7 and yeast Gon7 have low sequence identity, their structures and interactions with LAGE3 and Pcc1,



Fig. 6 Role of GON7 on KEOPS complex stability. **a** Immunoblot analysis of HEK293T cell lysates expressing either 2HA-tagged GON7 or V5-tagged LAGE3 alone or co-expressing both proteins. Anti-HA and anti-V5 antibodies were used to assess GON7 and LAGE3 expression, respectively, with α -tubulin used as loading control. **b** Representation of cycloheximide chase experiments by fitting a one-phase exponential decay curve to experimental data (one representative experiment is shown in Supplementary Fig. 9) (mean ± s.e.m. of n = 3 experiments). HEK293T cells were transfected with either 2HA-tagged GON7 or V5-tagged LAGE3 alone or with both proteins before being subjected to treatment with 100 µg/ml cycloheximide for the indicated time points in order to assess rates of protein degradation followed by western blotting of the cell lysates for both proteins with anti-HA and anti-V5 antibodies, respectively. GON7 and LAGE3 protein levels were normalized to those of α -tubulin at each time point. **c** Western blot analysis of protein expression level of the five KEOPS subunits in lymphoblastoid cell lines from two unaffected relatives (A.II-1 and A.II-5), four individuals with the *GON7* mutation p.Tyr*7, one individual with the *OSGEP* mutations p.Arg325Gln and p.Arg280His (individual «N2705» described in Braun et al.¹³), and one individual with GAMOS linked to *WDR73* mutations (individual A.II-4 described in Colin et al.¹⁵). One representative western blot is shown (three independent experiments were performed). α -Tubulin was used as a loading control. Source data are provided as a Source Data file

respectively, are nearly identical. It is therefore surprising that GON7 could not complement the yeast $\Delta gon7$ deletion mutant⁷. Comparison of the GON7/LAGE3 and Gon7/Pcc1 complexes shows that the hydrophobic character of the residues at the interface is very well conserved (Supplementary Fig. 7). However quite a few amino-acid substitutions between GON7 and Gon7 might create steric clashes that weaken or disrupt the interaction with Pcc1, explaining the lack of complementation. Nevertheless, the exquisite superposition of GON7 and Gon7 qualifies them as orthologs and confirms that GON7 is the functional fifth subunit of the human KEOPS complex. Such discrepancies between the protein sequence and structure conservation between distant species might be relevant in other protein complex, with their characterization helping to identify new candidate genes for human monogenic disorders.

An increasing number of mutations are being identified in genes encoding tRNA-modifying enzymes that are linked to human neurodevelopmental disorders. Very recently, mutations in *WDR4*, initially described to cause a distinct form of microcephalic primordial dwarfism and brain malformations^{30,31}, have been identified in individuals with GAMOS¹⁴. WDR4 is a component of the METTL1/WDR4 holoenzyme, an N⁷-methylguanosine (m⁷G) methyltransferase that is responsible for the highly conserved m⁷G modification on a specific subset of tRNAs^{32,33}. Interestingly, it has been shown that the absence of m⁷G tRNA modification leads to impaired cell proliferation, neural differentiation, and a decrease in global translation with a less efficient translation of mRNAs involved in cell division and brain development, consistent with the microcephaly and brain anomalies found in individuals with WDR4 mutations³⁴. Similarly, as a consequence of the decrease in t⁶A levels observed in affected individual's cells, perturbed protein translation could impact the translation of specific mRNA involved in kidney and brain development and/or podocyte/neuron maintenance. It is likely that the requirement for t⁶A-modified tRNAs levels is dependent of the cell-type and/or cell cycle as has been previously shown in D. melanogaster where highly proliferative cells of the wing imaginal discs are more affected by the absence of t⁶A modification than fully differentiated photoreceptors³⁵. Neuronal progenitors that have high mitotic activity probably have higher demands for protein translation, making them more vulnerable to any perturbation in the tight regulation of tRNA modifications. Furthermore, another potential regulatory step to spatiotemporally modulate these tRNA modifications and thus protein translation is the tissue- and developmental stage-specific expression of the tRNA-modifying enzymes^{36,37}. YRDC and

KEOPS subunits could be differentially expressed between specific cell-types in the brain (neural progenitors) and the kidney (podocytes) and/or during development/differentiation explaining the tissue involvement and the course of the disease as well as its clinical outcome. Further studies on neuronal/renal progenitors and neurons/podocytes differentiated from induced pluripotent stem cells obtained from individuals with mutations in YRDC and KEOPS subunits will probably provide further insights into the pathogenesis of GAMOS.

Together, our data strongly emphasize the importance and relevance of the t⁶A biosynthesis pathway in the pathogenesis of GAMOS. Further investigations are needed to fully characterize all the KEOPS mutations at the biochemical, structural, and enzyme activity levels to better understand their impact on KEOPS complex-dependent t⁶A biosynthesis activity and how they influence the clinical phenotypes. Genes encoding components of the t⁶A biosynthesis pathway have to be added to the growing list of translation-associated proteins whose loss of function are responsible for rare genetic disorders.

Methods

Patients and families. Written informed consent was obtained from participants or their legal guardians, and the study was approved by the Comité de Protection des Personnes "Ile-De-France II." Genomic DNA samples were isolated from peripheral blood leukocytes using standard procedures.

Whole-exome sequencing and mutation calling. We performed whole-exome sequencing using Agilent SureSelect All Exon 51 Mb V5 capture-kit on a HiSeq2500 (Illumina) sequencer (paired-end reads: 2 × 100 bases). Sequences were aligned to the human Genome Reference Consortium Human Build 37 (GRCh37) genome assembly with the Lifescope suite from Life Technologies. Variant calling was made using the Genome Analysis Toolkit pipeline. Then, variants were annotated using a pipeline designed by the Paris Descartes University Bioinformatics platform. We assumed the causal variant: (i) segregates with the disease status, (ii) is novel or has a minor allele frequency <1/1000 in gnomAD, (iii) was not found in >10/2352 projects of our in-house database. Missense variant pathogenicity was evaluated using in silico prediction tools (PolyPhen2, SIFT and Mutation Taster). Sanger sequencing was used to validate the variant identified by exome sequencing and to perform segregation analysis in the families. Sequence were analyzed with the Sequencher software (Gene Codes, Ann Arbor, MI) and positions of mutations were numbered from the A of the ATG-translation initiation codon. For Family G, WES, and SNP-array were performed according to standard diagnostic procedures and WES quality criteria at the UMC Utrecht, the Netherlands. The patient-parent quartet WES with sibling-sharing analysis focused on the regions of homozygosity determined by SNP-array (parents are consanguineous in the eighth degree).

Plasmids, cell culture, establishment of cell lines. The following expression vectors were used in this publication: LentiORF pLEX-MCS (Open Biosystems), pESC-TRP with a c-myc tag (Agilent), and pLKO.1-TRC Cloning vector (# Plasmid 10878, Addgene). The LentiORF pLEX-MCS plasmid was modified by sitedirected mutagenesis (QuickChange kit, Agilent) to insert one NheI restriction site, and either two copies of the Human influenza hemagglutinin (HA) tag or one copy of the V5 epitope tag allowing epitope-tagging at the N-terminal of the encoded protein. Human full-length GON7, LAGE3, and YRDC cDNA (NM_032490.5, NM_006014.4, and NM_024640.4, respectively) were amplified by PCR from IMAGE cDNA clones (IMAGE 4796574, IMAGE 5485603, IMAGE 5211591, and IMAGE 6147134, respectively), and subcloned into the modified pLEX-MCS plasmid using either SpeI and XhoI (for GON7 and LAGE3) or NheI and XhoI (for YRDC). Human YRDC cDNA was also subcloned into the BamHI and SalI sites of pESC-TRP. Site-directed mutagenesis (QuickChange kit, Agilent) was used to generate the mutations used in this study. An adapted cloning protocol was used to obtain the C-terminal extension found for the YRDC p.Val241Ilefs*72 mutant. For gene silencing, the shRNA sequences described in Supplementary Table 6 were cloned into the lentiviral pLKO.1-TRC Cloning Vector using the AgeI and EcoRI restriction sites. This vector contains a cassette conferring puromycin resistance. All constructs were verified by Sanger sequencing.

The human immortalized podocyte cell line (AB8/13) provided by M. Saleem (University of Bristol, UK) was grown at 33 °C with 7% CO₂ in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum, insulin-transferrin-selenium, glutamine, and penicillin and streptomycin (all from Life Technologies), and human primary fibroblasts, obtained from patient skin biopsies, were cultured in OPTIMEM medium supplemented with 10% fetal bovine serum, sodium pyruvate, glutamine, fungizone, and penicillin and streptomycin (all from Life Technologies) at 37 °C with 7% CO₂. Obtention and culture of lymphoblastoid cell lines are

detailed in Supplementary Methods. Human podocytes stably overexpressing 2HA-GON7 or V5-LAGE3, or transiently depleted for *GON7*, *LAGE3*, *OSGEP*, or *YRDC* were obtained by transduction with lentiviral particles and subsequent puromycin selection (2 µg/ml). HEK293T cells (ATCC CRL-3216) were transiently transfected using Lipofectamine[®] 2000 (ThermoFisher Scientific).

Antibodies and chemical compounds. The following antibodies were used in the study: mouse anti-a-tubulin (T5168, used at 1:1000), mouse anti-actin (A5316, used at 1:1000), mouse anti-HA (12CA5, at 1/1000), rabbit anti-GON7 (HPA 051832, used at 1:500), rabbit anti-LAGE3 (HPA 036122, used at 1/500), rabbit anti-TPRKB (HPA035712, used at 1:500), rabbit anti-OSGEP (HPA 039751, used at 1/1000), and mouse anti-GAPDH (MAB374, used at 1/2000) from Sigma-Aldrich; mouse anti-V5 (MCA1360, used at 1/1000) from Bio-Rad; rabbit anti-YRDC (PA5-56366, used at 1:500) from ThermoFisher Scientific; rabbit anti-LAGE3 (NBP2-32715, used at 1:1000) and mouse anti-OSGEP (NBP2-00823, used at 1:500) from Novus Biologicals; rabbit anti-TP53RK (AP17010b, used at 1:500) from Abgent. Secondary antibodies for immunoblotting were sheep: anti-mouse and donkey anti-rabbit HRP-conjugated antibodies (GE Healthcare, UK), and IRDye 800CW Donkey anti-rabbit (926-32213) and IRDye 680RD Donkey antimouse (926-68072) antibodies (LI-COR). Cycloheximide (C7698), Nuclease P1 (N8630), phosphodiesterase I from snake venom (P3243), and alkaline phosphatase (P4252) were purchased from Sigma-Aldrich.

Yeast culture and heterologous complementation assay. Yeast cells were grown at 28 °C in standard rich medium YEPD (1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose) or minimal supplemented media (0.67% YNB, 2% carbon source). Cells were transformed using the lithium acetate method³⁸. Media were supplemented with 2% agar for solid media. The *S. cerevisiae* W303 derived strain, *Asua5::KanMX* (YCplac33-*SUA5*)³⁹, was used as the host for the complementation assay. For each pESC-TRP plasmid derivative to be tested, three independent clones were selected after transformation and grown on GLU-TRP media. Clones were then streaked onto GAL-TRP containing 0.1% 5-fluoroorotic acid (5-FOA) to counter-select the YCplac33-*SUA5* plasmid (containing *URA3*). After two rounds of selection, clones were checked for their acquired Ura- phenotype, their plasmid content was confirmed by sequencing after plasmid rescue before being finally evaluated for fitness by a 10-fold serial dilution spotted onto GAL-TRP minimal supplemented media. Empty pESC-TRP. pESC-TRP-*SUA5*, and pESC-TRP.*SUA5-myc* were used as negative and positive controls, respectively.

Quantitative real-time PCR. Total mRNA from knocked down podocytes, primary skin fibroblasts, and LCLs was isolated using Qiagen Extraction RNeasy[®] Kit and treated with DNase I. One microgram total RNA was reverse-transcribed using Superscript II, according to the manufacturer's protocol (Life Technologies). The relative expression levels of the mRNA of interest were determined by real-time PCR using Power SYBR Green ROX Mix (ThermoFisher Scientific) with specific primers listed in Supplementary Table 7. Samples were run in triplicate and gene of interest expression was normalized to human hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase (*Hgprt*). Data were analyzed using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method.

Quantification of t⁶A modification. Yeast tRNAs were extracted and purified from actively growing cells (at OD_{600nm} of approximately 3×10^7 cells/ml) with phenol induced cell permeabilization, LiCl-selective precipitation, and subsequent ion exchange-chromatography purification on an AXR-80 column (Nucleobond, Macherey-Nagel), according to the manufacturer's instructions. For human primary fibroblasts, the two-step protocol that was applied is detailed in Supplementary Methods. Ten micrograms of yeast tRNAs and approximately 1 µg of human fibroblast tRNAs were then enzymatically hydrolyzed into ribonucleosides with nuclease P1, phosphodiesterase, and alkaline phosphatase, deproteonized by filtration, and finally dried under vacuum according to the protocol of Thuring et al.⁴⁰. t⁶A ribonucleoside was analyzed using the quantitative LC/MS-MS protocol of Thüring et al.⁴⁰. Quantification of t⁶A was performed by integration of the peaks of interest and expressed relative to the total area of the peaks corresponding to the four canonical unmodified ribonucleosides assessed in the same sample for normalization. tRNA extracted from three independent samples were each measured twice (two technical replicates). Detailed information are provided in Supplementary Methods.

Protein extraction and immunoblotting. Proteins from KD podocytes, primary fibroblasts, and LCLs were extracted in lysis buffer containing 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7, 0.5% Triton-X100 with CompleteTM protease inhibitors (Roche), as in Serrano-Perez et al.⁴¹. Fifty micrograms of proteins were loaded onto acrylamide gels and blotted onto nitrocellulose membranes (Amersham). The membranes were blocked in 1× Tris-buffered saline, 0.1% Tween 20 (TBST) with 5% bovine serum albumin or in Odyssey (LI-COR Bioscience) blocking buffer. Membranes were then incubated with the indicated primary antibodies, washed, and then incubated with either HRP-conjugated or LI-COR IRDy secondary antibodies. Signals were detected using ECL reagents (Amersham Biosciences) and acquired in a Fusion Fx7 darkroom (Viber Lourmat) or acquired with Odyssey CLx near-infrared fluorescent imaging system (LI-COR Bioscience). Densitometry

quantification was performed either using Bio-1D software or using *Image studio lite* software (version 5.2). Uncropped and unprocessed blots are provided in the Source Data file.

Immunoprecipitation and cycloheximide chase experiments. For immunoprecipitation, HEK293T cells were transiently transfected with the adequate plasmids (2HA-tagged GON7, V5-tagged-LAGE3 wild-type (WT) and/or mutants) using calcium phosphate. Forty-eight hours post transfection, cells were lysed in 150 mM NaCl, 25 mM Tris-HCl pH 8, 0.5% Triton with protease inhibitors and HA-tagged GON7 was immunoprecipitated using the µMACSTM Epitope Tag Protein Isolation Kit (Miltenyi Biotec). Briefly, fresh lysates (1-1.5 mg of protein) were incubated either with mouse anti-V5 antibodies, followed by a 30-min incubation with magnetic beads coupled to protein A, or directly with magnetic beads coupled to an HA antibody. Immunoprecipitated proteins were isolated using µMACS® Separation Columns in a magnetic µMACS separator and subsequently eluted with 1× Laemmli buffer. Lysates and immunoprecipitated samples were subjected to immunoblot⁴¹. To assess rates of protein degradation, HEK293T cells transiently expressing either 2HA-GON7 or V5-LAGE3 alone, or co-expressing both proteins were incubated with cycloheximide at a final concentration of 100 µg/ml for the indicated time periods (0.5, 1, 2, 4, and 6 h). Total protein extracts and immunoblotting were performed as described above. Anti-HA and anti-V5 antibodies were used to reveal GON7 and LAGE3, respectively. Relative GON7 and LAGE3 protein amounts were normalized to those of a-tubulin at each time point.

Cell proliferation, apoptosis, and protein synthesis assays. Cell proliferation, apoptosis level, and rates of protein synthesis were assessed in KD podocytes using the CellTiter 96 Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (MTT) (Promega), the Caspase-3/7 Green detection Reagent (C10423; ThermoFisher Scientific), and the Click-iT HPG Alexa Fluor 488 Protein Synthesis Assays (C10428; ThermoFisher Scientific), respectively, according to the manufacturer's instructions. Detailed information are provided in Supplementary Methods.

Proteomic studies. Human podocyte cell lines stably expressing either 2HA-GON7 or V5-LAGE3 were used to perform proteomic studies. 2HA-GON7 and V5-LAGE3 were immunoprecipitated as described in the section above. Eluates were processed according to Braun et al.¹³. Two groups (control IP versus IP HA or IP V5), each containing three biological replicates, were used for statistical analysis. Only proteins that were identified at least three times out of six were retained. A *t*-test was performed, and the data were represented in a volcano plot (FDR < 0.01, S0 = 2, 250 randomizations).

Telomeric restriction fragment. Measurement of the length of the terminal restriction fragments was performed by Southern blotting according to Touzot et al.⁴².

Expression and purification of KEOPS subunits. All structural work was done using the full-length proteins of GON7, LAGE3, and OSGEP.

For NMR experiments, two vectors were ordered from Genscript (Piscataway, USA) for the expression of either unlabeled his-tagged LAGE3 (vector "pET21a-LAGE3_hisTEV_op") or ¹⁵N-labeled his-tagged GON7 (vector "pET24d-C14_hisTEV_op") whose sequences are shown in Supplementary Table 8. Expression and purification of LAGE3 and ¹⁵N-GON7 and subcomplex LAGE3/ ¹⁵N-GON7 preparation are described in detail in Supplementary Methods.

For SAXS or crystallogenesis experiments, preparation of unlabeled GON7 and GON7/LAGE3/OSGEP subcomplex, and co-expression and purification of the KEOPS subunits are detailed in Supplementary Methods and Supplementary Figs. 12 and 13. Fractions of the heterotrimeric GON7/LAGE3/OSGEP complex eluted from size exclusion chromatography (Supplementary Table 9) were then re-loaded onto NiIDA and washed with lysis buffer A supplemented with increasing concentrations of NaCl (0.2; 0.5; 1, and 2 M) in order to remove traces of contaminants. Bound proteins were eluted using three fractions of 2 ml of buffer A supplemented with 100, 200, and 400 mM imidazole and the three subunits complex was concentrated to 8.3 mg/ml for crystallization trials. A unique crystal was obtained using the sitting-drop vapor diffusion method after more than 6 months incubation at 4 °C. The successful condition was composed of 100 nl of protein solution and 100 nl of 30% PEG 4000, 0.1 M Tris-HCl pH 8.5 and 0.2 M

Modeling and crystal structure determination. Modeling of YRDC: the Phyre2 and I-tasser webservers both proposed high confidence models for YRDC based on the StSua5 crystal structure despite weak sequence identity between the two species. A 3D model of YRDC was built using the MODELLER software⁴³. X-ray diffraction data collection was carried out on beamline Proxima1 at the SOLEIL Synchrotron (Saint-Aubin, France) at 100 K. Data were processed, integrated, and scaled with the XDS program package⁴⁴. The crystal belonged to space group P4₃. The OSGEP and LAGE3 subunits were positioned by molecular replacement with the programs PHASER⁴⁵ and MOLREP, implemented in the CCP4 suite⁴⁶ using the structures of MjKae1 (PDB ID: 2VWB) and ScPcc1 (PDB ID: 4WX8) as search

models. Residual electron density showed clearly the presence of the GON7 subunit, which was constructed using the program BUCCANEER⁴⁶. The initial structure was refined using the BUSTER program⁴⁷ and completed by interactive and manual model building using COOT⁴⁸. The correctness of the assigned GON7 sequence was verified by omit mFo-DFc, 2mFo-DFc, Prime-and-switch electron density maps⁴⁹ (Supplementary Fig. 14). One copy of the GON7/LAGE3/OSGEP heterotrimer was present in the asymmetric unit. Data collection and refinement statistics are gathered in Supplementary Table 5. The coordinates have been deposited at the Protein Data Bank (code 6GWJ).

Small-angle X-ray analysis. SAXS experiments were carried out at the SOLEIL synchrotron SWING beamline (Saint-Aubin, France). The sample to detector (Aviex CCD) distance was set to 1500 mm, allowing reliable data collection over the momentum transfer range 0.008 Å⁻¹ < q < 0.5 Å⁻¹ with $q = 4\pi \sin \theta / \lambda$, where 2θ is the scattering angle and λ is the wavelength of the X-rays ($\lambda = 1.0$ Å). To isolate the various species in solution, SAXS data were collected on samples eluting from an online size exclusion high-performance liquid chromatography (SEHPLCBio-SEC3Agilent) column and directly connected to the SAXS measuring cell. sixty-five microliters of GON7/LAGE3/OSGEP and GON7 samples concentrated at 1.5 and 6.7 mg/l, respectively, were injected into the column preequilibrated with a buffer composed of 20 mM MES pH 6.5, 200 mM NaCl, and 5 mM 2-mercaptoethanol. Flow rate was 300 µl/min, frame duration was 1.0 s, and the dead time between frames was 0.5 s. The protein concentration was estimated by UV absorption measurement at 280 and 295 nm using a spectrometer located immediately upstream of the SAXS measuring cell. A large number of frames were collected before the void volume and averaged to account for buffer scattering. SAXS data were normalized to the intensity of the incident beam and background (i.e. the elution buffer) subtracted using the program FoxTrot⁵⁰, the Swing in-house software. The scattered intensities were displayed on an absolute scale using the scattering by water. Identical frames under the main elution peak were selected and averaged for further analysis. Radii of gyration, maximum particle dimensions, and molecular masses were determined using PrimusQT⁵¹ (Supplementary Table 4). The BUNCH program⁵² was then used to build atomic models of GON7/LAGE3/OSGEP starting from the crystal structure and by determining the optimal position of the missing regions as to fit the data. In a final step, we substituted the dummy residues of these flexible parts with all-atom descriptions using the programs PD2 and SCWRL4 (ref. ⁵³). An ultimate adjustment was performed using the program CRYSOL⁵⁴. The modeling was repeated 10 times and the best model was deposited in SASBDB⁵⁵ with codes SASDFK8, SASDFM8, and SASDFL8 for GON7, GON7/LAGE3, and GON7/LAGE3/OSGEP, respectively.

Statistical analyses. GraphPad Prism 8.0 software was used for the graphical representation and statistical analysis of cell-based data. Results are presented as mean \pm s.e.m. of at least n = 3 independent experiments. For statistical analysis, data sets comparing more than three conditions (to a control group) were analyzed with ANOVA followed by Dunnett's multiple comparisons test or by using Kruskal–Wallis test followed by a Dunn's multiple comparisons test. Data sets with only two conditions to compare were analyzed using an unpaired *t*-test or a Mann–Whitney test. P < 0.05 was considered statistically significant. A standard confidence interval of 95% was applied in all analyses. Displayed in the figures are the mean values of all technical replicates for each of the independent experiments (displayed as single data points). Black lines indicate the mean values of all independent experiments.

Reporting summary. Further information on research design is available in the Nature Research Reporting Summary linked to this article.

Data availability

The source data underlying Figs. 3c–d, 4 and 6 and Supplementary Figs. 1, 5b, 8b, 9 and 10 are provided as a Source Data file. Patients' consent was not obtained for public deposition of whole-exome sequencing data, but these are available from the corresponding author upon reasonable request. Other data generated during the current study are available from the corresponding authors upon reasonable request. Accession codes for deposited data: crystal structure of GON7/LAGE3/OSGEP (PDB ID: 6GWJ, [https://www.rcsb.org/structure/6GWJ]); SAXS model codes SASDFK8, SASDFM8, and SASDFL8 for GON7, GON7/LAGE3, and GON7/LAGE3/OSGEP, respectively.

Received: 18 March 2019 Accepted: 9 August 2019 Published online: 03 September 2019

References

 El Yacoubi, B., Bailly, M. & de Crecy-Lagard, V. Biosynthesis and function of posttranscriptional modifications of transfer RNAs. *Annu. Rev. Genet.* 46, 69–95 (2012).

ARTICLE

- El Yacoubi, B. et al. A role for the universal Kae1/Qri7/YgjD (COG0533) family in tRNA modification. *EMBO J.* 30, 882–893 (2011).
- Srinivasan, M. et al. The highly conserved KEOPS/EKC complex is essential for a universal tRNA modification, t6A. *EMBO J.* 30, 873–881 (2011).
- Lauhon, C. T. Mechanism of N6-threonylcarbamoyladenonsine (t(6)A) biosynthesis: isolation and characterization of the intermediate threonylcarbamoyl-AMP. *Biochemistry* 51, 8950–8963 (2012).
- Costessi, A. et al. The human EKC/KEOPS complex is recruited to Cullin2 ubiquitin ligases by the human tumour antigen PRAME. PLoS One 7, e42822 (2012).
- Mao, D. Y. et al. Atomic structure of the KEOPS complex: an ancient protein kinase-containing molecular machine. *Mol. Cell* 32, 259–275 (2008).
- Wan, L. C. et al. Proteomic analysis of the human KEOPS complex identifies C140RF142 as a core subunit homologous to yeast Gon7. *Nucleic Acids Res.* 45, 805–817 (2017).
- Zhang, W. et al. Crystal structures of the Gon7/Pcc1 and Bud32/Cgi121 complexes provide a model for the complete yeast KEOPS complex. *Nucleic Acids Res.* 43, 3358–3372 (2015).
- Thiaville, P. C., Iwata-Reuyl, D. & de Crecy-Lagard, V. Diversity of the biosynthesis pathway for threonylcarbamoyladenosine (t(6)A), a universal modification of tRNA. *RNA Biol.* 11, 1529–1539 (2014).
- Ramos, J. & Fu, D. The emerging impact of tRNA modifications in the brain and nervous system. *Biochim. Biophys. Acta Gene Regul. Mech.* 1862, 412–428 (2019).
- 11. Galloway, W. H. & Mowat, A. P. Congenital microcephaly with hiatus hernia and nephrotic syndrome in two sibs. *J. Med. Genet.* **5**, 319–321 (1968).
- Braun, D. A. et al. Mutations in multiple components of the nuclear pore complex cause nephrotic syndrome. *J. Clin. Invest.* 128, 4313–4328 (2018).
- 13. Braun, D. A. et al. Mutations in KEOPS-complex genes cause nephrotic syndrome with primary microcephaly. *Nat. Genet.* **49**, 1529–1538 (2017).
- 14. Braun, D. A. et al. Mutations in WDR4 as a new cause of Galloway-Mowat syndrome. Am. J. Med. Genet. A 176, 2460-2465 (2018).
- Colin, E. et al. Loss-of-function mutations in WDR73 are responsible for microcephaly and steroid-resistant nephrotic syndrome: Galloway-Mowat syndrome. Am. J. Hum. Genet. 95, 637–648 (2014).
- Fujita, A. et al. Homozygous splicing mutation in NUP133 causes Galloway-Mowat syndrome. Ann. Neurol. 84, 814–828 (2018).
- Rosti, R. O. et al. Homozygous mutation in NUP107 leads to microcephaly with steroid-resistant nephrotic condition similar to Galloway-Mowat syndrome. J. Med. Genet. 54, 399–403 (2017).
- Vodopiutz, J. et al. WDR73 mutations cause infantile neurodegeneration and variable glomerular kidney disease. *Hum. Mutat.* 36, 1021–1028 (2015).
- Parthier, C. et al. The O-carbamoyltransferase TobZ catalyzes an ancient enzymatic reaction. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 51, 4046–4052 (2012).
- El Yacoubi, B. et al. The universal YrdC/Sua5 family is required for the formation of threonylcarbamoyladenosine in tRNA. *Nucleic Acids Res.* 37, 2894–2909 (2009).
- 21. Kisseleva-Romanova, E. et al. Yeast homolog of a cancer-testis antigen defines a new transcription complex. *EMBO J.* **25**, 3576–3585 (2006).
- Downey, M. et al. A genome-wide screen identifies the evolutionarily conserved KEOPS complex as a telomere regulator. *Cell* 124, 1155–1168 (2006).
- Hecker, A. et al. Structure of the archaeal Kae1/Bud32 fusion protein MJ1130: a model for the eukaryotic EKC/KEOPS subcomplex. *EMBO J.* 27, 2340–2351 (2008).
- 24. Liu, Y. Y. et al. Yeast KEOPS complex regulates telomere length independently of its t(6)A modification function. *J. Genet. Genomics* **45**, 247–257 (2018).
- Saleem, M. A. et al. A conditionally immortalized human podocyte cell line demonstrating nephrin and podocin expression. J. Am. Soc. Nephrol. 13, 630–638 (2002).
- Thiaville, P. C. et al. Global translational impacts of the loss of the tRNA modification t(6)A in yeast. *Micro Cell.*3, 29–45 (2016).
- Bizien, T. et al. A brief survey of state-of-the-art BioSAXS. Protein Pept. Lett. 23, 217–231 (2016).
- Blomen, V. A. et al. Gene essentiality and synthetic lethality in haploid human cells. *Science* 350, 1092–1096 (2015).
- 29. Wan, L. C. et al. Structural and functional characterization of KEOPS dimerization by Pcc1 and its role in t6A biosynthesis. *Nucleic Acids Res.* 44, 6971–6980 (2016).
- Shaheen, R. et al. Mutation in WDR4 impairs tRNA m(7)G46 methylation and causes a distinct form of microcephalic primordial dwarfism. *Genome Biol.* 16, 210 (2015).
- Trimouille, A. et al. Further delineation of the phenotype caused by biallelic variants in the WDR4 gene. *Clin. Genet.* 93, 374–377 (2018).
- Alexandrov, A., Martzen, M. R. & Phizicky, E. M. Two proteins that form a complex are required for 7-methylguanosine modification of yeast tRNA. *RNA* 8, 1253–1266 (2002).

- Leulliot, N. et al. Structure of the yeast tRNA m7G methylation complex. Structure 16, 52–61 (2008).
- Lin, S. et al. Mettl1/Wdr4-Mediated m(7)G tRNA methylome is required for normal mRNA translation and embryonic stem cell self-renewal and differentiation. *Mol. Cell* 71, 244–255 e245 (2018).
- Rojas-Benitez, D., Eggers, C. & Glavic, A. Modulation of the proteostasis machinery to overcome stress caused by diminished levels of t6A-modified tRNAs in Drosophila. *Biomolecules* 7, https://doi.org/10.3390/biom7010025 (2017).
- de Crecy-Lagard, V. et al. Matching tRNA modifications in humans to their known and predicted enzymes. *Nucleic Acids Res.* 47, 2143–2159 (2019).
- Uhlen, M. et al. Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. Science 347, 1260419 (2015).
- Gietz, R. D. & Schiestl, R. H. High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Nat. Protoc.* 2, 31–34 (2007).
- Pichard-Kostuch, A. et al. Structure-function analysis of Sua5 protein reveals novel functional motifs required for the biosynthesis of the universal t(6)A tRNA modification. RNA 24, 926–938 (2018).
- Thuring, K., Schmid, K., Keller, P. & Helm, M. Analysis of RNA modifications by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Methods* 107, 48–56 (2016).
- Serrano-Perez, M. C. et al. Endoplasmic reticulum-retained podocin mutants are massively degraded by the proteasome. J. Biol. Chem. 293, 4122–4133 (2018).
- 42. Touzot, F. et al. Function of Apollo (SNM1B) at telomere highlighted by a splice variant identified in a patient with Hoyeraal-Hreidarsson syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**, 10097–10102 (2010).
- Sali, A., Potterton, L., Yuan, F., van Vlijmen, H. & Karplus, M. Evaluation of comparative protein modeling by MODELLER. *Proteins* 23, 318–326 (1995).
- 44. Kabsch, W. Xds. Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 66, 125-132 (2010).
- McCoy, A. J. et al. Phaser crystallographic software. J. Appl. Crystallogr. 40, 658–674 (2007).
- Winn, M. D. et al. Overview of the CCP4 suite and current developments. Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 67, 235–242 (2011).
- Bricogne G. et al. BUSTER version 2.10.3 (Global Phasing Ltd, Cambridge, UK, 2017).
- Emsley, P. & Cowtan, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 60, 2126–2132 (2004).
- Terwilliger, T. C. Using prime-and-switch phasing to reduce model bias in molecular replacement. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 60, 2144–2149 (2004).
- David, G. & Perez, J. Combined sampler robot and high-performance liquid chromatography: a fully automated system for biological small-angle X-ray scattering experiments at the Synchrotron SOLEIL SWING beamline. J. Appl. Cryst. 42, 892–900 (2009).
- Franke, D. et al. ATSAS 2.8: a comprehensive data analysis suite for smallangle scattering from macromolecular solutions. *J. Appl. Crystallogr.* 50, 1212–1225 (2017).
- Petoukhov, M. V. & Svergun, D. I. Global rigid body modeling of macromolecular complexes against small-angle scattering data. *Biophys. J.* 89, 1237–1250 (2005).
- Krivov, G. G., Shapovalov, M. V. & Dunbrack, R. L. Jr. Improved prediction of protein side-chain conformations with SCWRL4. *Proteins* 77, 778–795 (2009).
- Švergun, D., Barberato, C. & Koch, M. H. J. CRYSOL—a program to evaluate X-ray solution scattering of biological macromolecules from atomic coordinates. J. Appl. Cryst. 28, 768–773 (1995).
- Valentini, E., Kikhney, A. G., Previtali, G., Jeffries, C. M. & Svergun, D. I. SASBDB, a repository for biological small-angle scattering data. *Nucleic Acids Res.* 43, D357–D363 (2015).

Acknowledgements

We are grateful to the patients and their families for their participation. We thank Dr A. Lahoche, Dr. A. Bennour, Dr. C. Loirat, Dr. K. van Gassen, Dr. M. Lilien, and Dr. M. van der Heide-Jalving who helped in the diagnostic process and the follow-up of our patients. We thank G. Froment, D. Nègre, and C. Costa from the lentivector production facility/ SFR BioSciences Gerland-Lyon Sud (UMS3444/US8). We acknowledge the use of the biosources of the Necker Imagine DNA biobank (BB-033-00065) and I. Rouvet from CBC BioTec at the CRB-HCL (Hospices Civils de Lyon). We thank Olivier Namy (I2BC, Gif-sur-Yvette, France) for his helpful advices and expertise during the revision process of this article. This work was supported by the Fondation pour le Recherche Médicale (project DEQ2015031682) (to C. Antignac), the European Union's Seventh Framework Programme (FP7/2012, grant 305608 EURenOmics) (to C. Antignac), the Investments for the Future Program (grant ANR-10-IAHY-01) (to C. Antignac), ANR KeoGamo (ANR-18-CE11-0008-01) (to G. Mollet and H.v.T.). This work was supported by the French Infrastructure for Integrated Structural Biology (FRISBI) (ANR-10-INSB-05-01) (to H.v.T.) and the Dutch Kidney Foundation (grant 15OP14) (to A.M.v.E.). S.M. is supported by a Ph.D. grant of the Fondation pour le Recherche Médicale (FRM). P.R. is a scientist from Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS).

Author contributions

R.S., O.G., O.B., E.M., F.N., D.A.B., M.P., C.M., A.M.v.E., F.H., D.M., and C. Antignac performed exome sequencing, bioinformatics analysis of exome sequencing data, wholeexome evaluation, Sanger sequencing, and mutation analysis. R.S., O.B., M.C., S.D, R.N., M.-A.M., B.R., J.B., A.L., D.A.B., A.M.v.E., D.M., F.H., and C. Antignac recruited patients and collected detailed clinical information for the study. N.B. provided MRI from control individuals and critically interpreted MRI images from patients. S.C.-F., R.S., and A.M.v.E. provided and analyzed images of renal histology and electron microscopy. C. Arrondel, J.P., B.C., D.L., G. Martin, E.M., and F.N. performed design of expression vectors used in this study. C. Arrondel generated knockdown cell lines, performed in vitro studies (proliferation, apoptosis, and protein synthesis) in immortalized human podocytes, and performed purification of human tRNAs. C. Arrondel, J.P., G. Menara, L.B., G. Martin, E.M., and F.N. performed cell experiments (co-immunoprecipitation, cycloheximide chase, cell culture), qPCR, and western blot experiments. S.M. performed proteins expression and purifications, cristallogenesis trials, diffraction data collection, 3D structure resolution, SAXS data collection, and analysis. B.C. performed OSGEP/ LAGE3/GON7-his expression and purification, and nucleosides preparation from tRNA samples and YRDC WT and mutant enzymatic assay. D.L. performed yeast complementation studies, expression, and purification of yeast tRNAs. D.D. performed SAXS data collection and analysis. E.L. collected and analyzed NMR experiments. A.-C.B. and S.S. performed HPLC MS/MS t⁶A modification analysis. G. Mollet, G. Martin, and I.C.G. performed proteomic studies in human podocyte cell lines. P.R. performed telomere restriction-fragment assays. C. Arrondel, S.M., J.P., G. Menara, B.C., D.L., D.D., O.G., O.B., L.B., G. Martin, E.M., F.N., E.L., A.-C.B., S.S., I.C.G., P.R., M.P., C.M., A.M.v.E., D.M., C. Antignac, H.v.T., and G.Mollet contributed to the interpretation of the data. G. Mollet, H.v.T. and C.Antignac conceived and coordinated the study, and wrote the manuscript with the input of B.C., D.L., S.M., and C. Arrondel. All authors critically analyzed and edited the manuscript.

Competing interests: F.H. is a cofounder and SAB member of Goldfinch-Bio. The remaining authors declare no competing interests.

Reprints and permission information is available online at http://npg.nature.com/ reprintsandpermissions/

Peer review information: *Nature Communications* thanks Piotr Neumann, Kazuhito Tomizawa, and other anonymous reviewer(s) for their contribution to the peer review of this work. Peer reviewer reports are available.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit http://creativecommons.org/ licenses/by/4.0/.

© The Author(s) 2019

Additional information

Supplementary Information accompanies this paper at https://doi.org/10.1038/s41467-019-11951-x.

Christelle Arrondel^{1,24}, Sophia Missoury^{2,24}, Rozemarijn Snoek ^{3,4}, Julie Patat ¹, Giulia Menara¹, Bruno Collinet ^{2,5}, Dominique Liger², Dominique Durand ², Olivier Gribouval ¹, Olivia Boyer ^{1,6}, Laurine Buscara¹, Gaëlle Martin¹, Eduardo Machuca¹, Fabien Nevo¹, Ewen Lescop⁷, Daniela A. Braun⁸, Anne-Claire Boschat ⁹, Sylvia Sanquer^{10,11}, Ida Chiara Guerrera¹², Patrick Revy¹³, Mélanie Parisot ¹⁴, Cécile Masson¹⁵, Nathalie Boddaert¹⁶, Marina Charbit⁶, Stéphane Decramer¹⁷, Robert Novo¹⁸, Marie-Alice Macher¹⁹, Bruno Ranchin²⁰, Justine Bacchetta²⁰, Audrey Laurent²⁰, Sophie Collardeau-Frachon ²¹, Albertien M. van Eerde^{3,4}, Friedhelm Hildebrandt ⁸, Daniella Magen²², Corinne Antignac ^{1,23}, Herman van Tilbeurgh² & Géraldine Mollet ¹

¹Laboratory of Hereditary Kidney Diseases, INSERM UMR1163, Université de Paris, Imagine Institute, Paris, France. ²Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), CEA, CNRS, Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Gif-sur-Yvette, France. ³Department of Genetics, University Medical Center Utrecht, Utrecht, The Netherlands. ⁴Center for Molecular Medicine, Utrecht University, Utrecht, The Netherlands. ⁵Institut de Minéralogie, de Physique des Matériaux et de Cosmochimie, UMR7590 CNRS/Sorbonne-Université, UPMC, Paris, France. ⁶Department of Pediatric Nephrology, AP-HP. Necker Hospital, Paris, France, ⁷Institut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS UPR2301, Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Gif-sur-Yvette, France. ⁸Department of Medicine, Boston Children's Hospital, Harvard Medical School, Boston, MA, USA. ⁹Mass Spectrometry Facility, INSERM UMR1163, Imagine Institute, Paris, France. ¹⁰Service de Biochimie métabolomique et protéomique, Hôpital Necker-Enfants Malades, Paris, France. ¹¹INSERM UMR-S1124, Université de Paris, Paris, France. ¹²Proteomics Platform 3P5-Necker, Université de Paris—Structure Fédérative de Recherche Necker, Inserm US24/CNRS, UMS3633 Paris, France. ¹³Inserm UMR1163, Laboratory of Genome Dynamics in the Immune System, Labellisé Ligue contre le Cancer, Université de Paris, Imagine Institute, Paris, France. ¹⁴Genomics Core Facility, Structure Fédérative de Recherche Necker, INSERM U1163 and Inserm US24/CNRS UMS3633, Université de Paris, Paris, France.¹⁵Bioinformatics Platform, INSERM UMR1163, Université de Paris, Imagine Institute, Paris, France. ¹⁶Department of Pediatric Radiology, and Imagine Institute, INSERM UMR 1163 and INSERM U1000, Université de Paris, Hôpital Necker-Enfants Malades, Paris, France. ¹⁷Department of Pediatric Nephrology-Internal Medicine, Purpan Hospital, Toulouse, France. ¹⁸Pediatric Nephrology Unit, University Hospital of Lille, Lille, France. ¹⁹Department of Pediatric Nephrology, AP-HP, Robert Debre Hospital, Paris, France. ²⁰Service de Néphrologie, Rhumatologie et Dermatologie pédiatriques, Hospices Civils de Lyon, Hôpital Femme-Mère-Enfant, Centre de référence de maladies rénales rares, Université de Lyon, France. ²¹Department of Pathology, Hospices Civils de Lyon-Hôpital Femme-Mère-Enfant, Claude Bernard Lyon 1 University, Bron, France. ²²Pediatric Nephrology Institute-Rambam Health Care Campus-Technion Faculty of Medicine, Haifa, Israel. ²³Department of Genetics, AP-HP, Necker Hospital, Paris, France. ²⁴These authors contributed equally: Christelle Arrondel, Sophia Missoury.

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA TERRE

Études fonctionnelles de gènes mutés dans les syndromes néphrotiques héréditaires

Julie PATAT

Le syndrome néphrotique (SN) est caractérisé par une fuite massive de protéines dans les urines due à une altération du filtre glomérulaire, dont le podocyte est un composant essentiel. L'atteinte rénale peut être associée à des anomalies neurologiques comme dans le syndrome de Galloway-Mowat (GAMOS). L'étude de formes familiales rares de SN a permis d'identifier des mutations dans de nombreux gènes codant des protéines exprimées par le podocyte. Cependant, dans environ la moitié des cas familiaux de SN, le gène impliqué dans la maladie reste inconnu, et il n'existe à ce jour aucun traitement, mis à part la dialyse et la transplantation rénale.

Au cours de ce travail, j'ai participé à deux projets de recherche, l'un portant sur l'étude de deux mutations identifiées dans deux gènes candidats chez des patients avec un SN syndromique en utilisant le modèle de la Drosophile, l'autre portant sur l'étude des conséquences fonctionnelles des mutations du complexe KEOPS, identifiées chez des patients avec GAMOS, dans des modèles *in vitro* et *in vivo*.

Pour la première partie de mon travail, j'ai travaillé sur deux variants homozygotes identifiés dans les gènes *ADD3* et *KAT2B* chez des enfants présentant un SN associé à une microcéphalie et une cardiomyopathie. Le premier gène code l'adducine-γ, un important régulateur du cytosquelette d'actine, et le second pour la lysine acétyltransférase KAT2B responsable de l'acétylation des histones. Mon projet avait pour but d'évaluer la pathogénicité des mutations pour définir leur contribution au phénotype des patients en utilisant le modèle de la Drosophile. J'ai réalisé des expériences d'extinction de l'expression de ces deux gènes, séparément puis simultanément, suivi par des expériences de « sauvetage » pour étudier le phénotype des néphrocytes, équivalents chez la Drosophile des podocytes. Les résultats obtenus ont montré que la mutation d'*ADD3* seule n'affecte pas les néphrocytes, alors que la mutation de *KAT2B* entraîne des défauts des néphrocytes. De plus, la suppression simultanée dans les néphrocytes de l'expression des gènes *ADD3* et *KAT2B* altère de façon synergique les néphrocytes et l'expression de la mutation d'*ADD3* ne permet pas de restaurer le phénotype sauvage. L'ensemble de nos résultats suggère que les mutations dans les deux gènes sont nécessaires à l'apparition de l'atteinte rénale chez ces patients.

Pour la seconde partie de ce travail, j'ai étudié le complexe KEOPS, un complexe protéique composé de 5 sous-unités qui associé à l'enzyme YRDC est responsable de la biosynthèse de la modification t⁶A sur les ARN de transfert (ARNt) jouant un rôle primordial dans la fidélité de la traduction. Le but de ce projet est de comprendre le rôle de la nouvelle sous-unité GON7, une protéine intrinsèquement désordonnée, sur la stabilité du complexe KEOPS, en particulier sur la sous-unité LAGE3 qui interagit directement avec GON7. Nous avons montré que les protéines GON7 et LAGE3 ont une demivie plus courte lorsqu'elles sont exprimées individuellement alors que leur demi-vie augmente lorsqu'elles sont co-exprimées, suggérant que l'interaction stabilise les deux protéines. En parallèle, j'ai développé des modèles murins de « knock-in » (KI) en insérant une mutation dans le gène *Osgep* ou dans le gène *Lage3* par CRISPR/Cas9 afin d'étudier l'effet des mutations sur le développement de l'atteinte rénale et neurologique. Les résultats obtenus à ce jour indiquent que les souris KI ne présentent aucun signe clinique (absence de protéinurie) et histologique évident d'atteinte rénale ou cérébrale, suggérant que le modèle murin ne reproduit pas les atteintes observées chez les patients avec GAMOS. Cependant, des études plus approfondies sont en cours afin de valider l'absence totale de phénotype rénal et cérébral.

MOTS- CLÉS : syndrome néphrotique, microcéphalie, ARNt, GAMOS, modèles animaux, CRISPR/Cas9