



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-thesesexercice-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Université de Lorraine – Faculté de Médecine de Nancy

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR EN MÉDECINE

Présentée et soutenue publiquement

dans le cadre du troisième cycle de Médecine Spécialisée

par

Thomas QUINAUX

le 8 avril 2020

**Corrélation génotype/phénotype en termes de réponse ostéoclastique chez
les patients atteints de cystinose.**

Membres du jury :

M. Cyril SCHWEITZER	Professeur	Président du jury
Mme Justine BACCHETTA	Professeur	Juge et Directrice
M. Luc FRIMAT	Professeur	Juge
Mme Isabelle VRILLON	Docteur	Juge
M. Benjamin SAVENKOFF	Docteur	Juge

Président de l'Université de Lorraine :
Professeur Pierre MUTZENHARDT

Doyen de la Faculté de Médecine
Professeur Marc BRAUN

Vice-doyenne
Pr Laure JOLY

Assesseurs :

Premier cycle : Dr Nicolas GAMBIER
Deuxième cycle : Dr Antoine KIMMOUN
Troisième cycle : Pr Laure JOLY
Formation à la recherche : Pr Nelly AGRINIER
Relations Grande Région : Pr Thomas FUCHS-BUDER
CUESIM : Pr Stéphane ZUILY
SIDES : Dr Julien BROSEUS
Vie Facultaire : Dr Philippe GUERCI
Etudiant : Mme Audrey MOUGEL

Chargés de mission

Docimologie : Dr Jacques JONAS
Orthophonie : Pr Cécile PARIETTI-WINKLER
PACES : Pr Mathias POUSSEL
Relations internationales : Pr Jacques HUBERT

Présidente du Conseil de la Pédagogie : Pr Louise TYVAERT
Président du Conseil Scientifique : Pr Jean-Michel HASCOET

=====

DOYENS HONORAIRES

Professeur Jean-Bernard DUREUX - Professeur Jacques ROLAND - Professeur Patrick NETTER - Professeur Henry COUDANE

=====

PROFESSEURS HONORAIRES

Etienne ALIOT - Jean-Marie ANDRE - Alain AUBREGE - Gérard BARROCHE - Alain BERTRAND - Pierre BEY - Marc-André BIGARD - Patrick BOISSEL – Pierre BORDIGONI - Jacques BORRELLY - Michel BOULANGE - Jean-Louis BOUTROY - Serge BRIANÇON - Jean-Claude BURDIN - Claude BURLET - Daniel BURNEL - Claude CHARDOT - Jean-François CHASSAGNE - François CHERRIER - Henry COUDANE - Jean-Pierre CRANCE - Jean-Pierre DESCHAMPS - Jean-Bernard DUREUX - Gilbert FAURE - Gérard FIEVE - Bernard FOLIGUET - Jean FLOQUET - Robert FRISCH - Alain GAUCHER - Pierre GAUCHER - Jean-Luc GEORGE - Alain GERARD - Hubert GERARD - Jean-Marie GILGENKRANTZ - Simone GILGENKRANTZ - Gilles GROSDIDIER - François GUILLEMIN - Philippe HARTEMANN - Gérard HUBERT - Claude HURIET - Michèle KESSLER - François KOHLER - Henri LAMBERT - Pierre LANDES Pierre LASCOMBES - Marie-Claire LAXENAIRE - Michel LAXENAIRE - Alain LE FAOU - Jacques LECLERE - Pierre LEDERLIN - Bernard LEGRAS - Jean-Pierre MALLIÉ - Philippe MANGIN - François MARCHAL - Jean-Claude MARCHAL - Yves MARTINET - Pierre MATHIEU - Michel MERLE - Daniel MOLÉ - Pierre MONIN - Pierre NABET - Patrick NETTER - Jean-Pierre NICOLAS - Francis PENIN - Claude PERRIN - Luc PICARD - François PLENAT - Jean-Marie POLU - Jacques POUREL - Francis RAPHAEL - Antoine RASPILLER - Denis REGENT - Jacques ROLAND - Daniel SCHMITT - Michel SCHMITT - Michel SCHWEITZER - Daniel SIBERTIN-BLANC - Claude SIMON - Danièle SOMMELET - Jean-François STOLTZ - Michel STRICKER - Gilbert THIBAUT - Paul VERT - Hervé VESPIGNANI - Colette VIDAILHET - Michel VIDAILHET - Jean-Pierre VILLEMOT - Michel WEBER - Denis ZMIROU - Faïez ZANNAD

=====

PROFESSEURS ÉMÉRITES

Etienne ALIOT - Pierre BEY - Henry COUDANE - Serge BRIANÇON - Jean-Marie GILGENKRANTZ - Simone GILGENKRANTZ - Michèle KESSLER - Alain LE FAOU - Patrick NETTER - Jean-Pierre NICOLAS – Luc PICARD - François PLENAT - Jean-Pierre VILLEMOT - Faïez ZANNAD

=====

PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS HOSPITALIERS

(Disciplines du Conseil National des Universités)

42^e Section : MORPHOLOGIE ET MORPHOGENÈSE

1^{re} sous-section : (Anatomie)

Professeur Marc BRAUN – Professeure Manuela PEREZ

2^e sous-section : (Histologie, embryologie et cytogénétique)

Professeur Christo CHRISTOV

3^e sous-section : (Anatomie et cytologie pathologiques)

Professeur Guillaume GAUCHOTTE

43^e Section : BIOPHYSIQUE ET IMAGERIE MÉDICALE

1^{re} sous-section : (Biophysique et médecine nucléaire)

Professeur Gilles KARCHER – Professeur Pierre-Yves MARIE – Professeur Pierre OLIVIER - Professeur Antoine VERGER

2^e sous-section : (Radiologie et imagerie médicale)

Professeur René ANXIONNAT - Professeur Alain BLUM - Professeur Serge BRACARD - Professeure Valérie CROISÉ -

Professeur Jacques FELBLINGER - Professeur Benjamin GORY - Professeur Damien MANDRY - Professeur Pedro GONDIM TEIXEIRA

44^e Section : BIOCHIMIE, BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE, PHYSIOLOGIE ET NUTRITION

1^{re} sous-section : (Biochimie et biologie moléculaire)

Professeur Jean-Louis GUEANT - Professeur Bernard NAMOUR - Professeur Jean-Luc OLIVIER

2^e sous-section : (Physiologie)

Professeur Christian BEYAERT - Professeur Bruno CHENUÉL - Professeur Mathias POUSSEL

3^e sous-section (Biologie cellulaire)

Professeure Véronique DECOT-MAILLERET

4^e sous-section : (Nutrition)

Professeur Didier QUILLIOT - Professeure Rosa-Maria RODRIGUEZ-GUEANT - Professeur Olivier ZIEGLER

45^e Section : MICROBIOLOGIE, MALADIES TRANSMISSIBLES ET HYGIÈNE

1^{re} sous-section : (Bactériologie – virologie ; hygiène hospitalière)

Professeur Alain LOZNIEWSKI – Professeure Evelyne SCHVOERER

2^e sous-section : (Parasitologie et Mycologie)

Professeure Marie MACHOUART

3^e sous-section : (Maladies infectieuses ; maladies tropicales)

Professeur Bruno HOEN - Professeur Thierry MAY - Professeure Céline PULCINI - Professeur Christian RABAUD

46^e Section : SANTÉ PUBLIQUE, ENVIRONNEMENT ET SOCIÉTÉ

1^{re} sous-section : (Épidémiologie, économie de la santé et prévention)

Professeure Nelly AGRINIER - Professeur Francis GUILLEMIN

4^e sous-section : (Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication)

Professeure Eliane ALBUISSON - Professeur Nicolas JAY

47^e Section : CANCÉROLOGIE, GÉNÉTIQUE, HÉMATOLOGIE, IMMUNOLOGIE

1^{re} sous-section : (Hématologie ; transfusion)

Professeur Pierre FEUGIER

2^e sous-section : (Cancérologie ; radiothérapie)

Professeur Thierry CONROY - Professeur Frédéric MARCHAL - Professeur Didier PEIFFERT - Professeur Guillaume VOGIN

3^e sous-section : (Immunologie)

Professeur Marcelo DE CARVALHO-BITTENCOURT - Professeure Marie-Thérèse RUBIO

4^e sous-section : (Génétique)

Professeur Philippe JONVEAUX - Professeur Bruno LEHEUP

48^e Section : ANESTHÉSIOLOGIE, RÉANIMATION, MÉDECINE D'URGENCE, PHARMACOLOGIE THÉRAPEUTIQUE

1^{re} sous-section : (Anesthésiologie-réanimation et médecine péri-opératoire)

Professeur Gérard AUDIBERT - Professeur Hervé BOUAZIZ - Professeur Thomas FUCHS-BUDER

Professeure Marie-Reine LOSSER - Professeur Claude MEISTELMAN

2^e sous-section : (Médecine intensive-réanimation)

Professeur Pierre-Édouard BOLLAERT - Professeur Sébastien GIBOT - Professeur Bruno LÉVY

3^e sous-section : (Pharmacologie fondamentale ; pharmacologie clinique ; addictologie)

Professeur Pierre GILLET - Professeur Jean-Yves JOUZEAU

4^e sous-section : (Thérapeutique-médecine de la douleur ; addictologie)

Professeur Nicolas GIRERD - Professeur François PAILLE - Professeur Patrick ROSSIGNOL

49^e Section : PATHOLOGIE NERVEUSE ET MUSCULAIRE, PATHOLOGIE MENTALE, HANDICAP ET RÉÉDUCATION

1^{re} sous-section : (Neurologie)

Professeur Marc DEBOUVERIE - Professeur Louis MAILLARD - Professeur Sébastien RICHARD - Professeur Luc TAILLANDIER
Professeure Louise TYVAERT

2^e sous-section : (Neurochirurgie)

Professeur Thierry CIVIT - Professeure Sophie COLNAT-COULBOIS - Professeur Olivier KLEIN

3^e sous-section : (Psychiatrie d'adultes ; addictologie)

Professeur Jean-Pierre KAHN – Professeur Vincent LAPREVOTE - Professeur Raymund SCHWAN

4^e sous-section : (Pédopsychiatrie ; addictologie)

Professeur Bernard KABUTH

5^e sous-section : (Médecine physique et de réadaptation)

Professeur Jean PAYSANT

50^e Section : PATHOLOGIE OSTÉO-ARTICULAIRE, DERMATOLOGIE ET CHIRURGIE PLASTIQUE

1^{re} sous-section : (Rhumatologie)

Professeure Isabelle CHARY-VALCKENAERE - Professeur Damien LOEUILLE

2^e sous-section : (Chirurgie orthopédique et traumatologique)

Professeur Laurent GALOIS - Professeur Didier MAINARD - Professeur François SIRVEAUX

3^e sous-section : (Dermato-vénéréologie)

Professeure Anne-Claire BURSZTEJN - Professeur Jean-Luc SCHMUTZ

4^e sous-section : (Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique ; brûlologie)

Professeur François DAP - Professeur Gilles DAUTEL - Professeur Etienne SIMON

51^e Section : PATHOLOGIE CARDIO-RESPIRATOIRE ET VASCULAIRE

1^{re} sous-section : (Pneumologie ; addictologie)

Professeur Jean-François CHABOT - Professeur Ari CHAOUAT

2^e sous-section : (Cardiologie)

Professeur Edoardo CAMENZIND - Professeur Christian de CHILLOU DE CHURET - Professeur Yves JUILLIERE
Professeur Nicolas SADOUL

3^e sous-section : (Chirurgie thoracique et cardiovasculaire)

Professeur Juan-Pablo MAUREIRA - Professeur Stéphane RENAUD

4^e sous-section : (Chirurgie vasculaire ; médecine vasculaire)

Professeur Sergueï MALIKOV - Professeur Denis WAHL – Professeur Stéphane ZUILY

52^e Section : MALADIES DES APPAREILS DIGESTIF ET URINAIRE

1^{re} sous-section : (Gastroentérologie ; hépatologie ; addictologie)

Professeur Jean-Pierre BRONOWICKI - Professeur Laurent PEYRIN-BIROULET

2^e sous-section : (Chirurgie viscérale et digestive)

Professeur Ahmet AYAV - Professeur Laurent BRESLER - Professeur Laurent BRUNAUD – Professeure Adeline GERMAIN

3^e sous-section : (Néphrologie)

Professeur Luc FRIMAT - Professeure Dominique HESTIN

4^e sous-section : (Urologie)

Professeur Pascal ESCHWEGE - Professeur Jacques HUBERT

53^e Section : MÉDECINE INTERNE, GÉRIATRIE ET MÉDECINE GÉNÉRALE

1^{re} sous-section : (Médecine interne ; gériatrie et biologie du vieillissement ; addictologie)

Professeur Athanase BENETOS - Professeur Jean-Dominique DE KORWIN - Professeure Gisèle KANNY
Professeure Christine PERRET-GUILLAUME – Professeur Roland JAUSSAUD – Professeure Laure JOLY

3^e sous-section : (Médecine générale)

Professeur Jean-Marc BOIVIN – Professeur Paolo DI PATRIZIO

54^e Section : DÉVELOPPEMENT ET PATHOLOGIE DE L'ENFANT, GYNÉCOLOGIE-OBSTÉTRIQUE, ENDOCRINOLOGIE ET REPRODUCTION

1^{re} sous-section : (Pédiatrie)

Professeur Pascal CHASTAGNER - Professeur François FEILLET - Professeur Jean-Michel HASCOET
Professeur Emmanuel RAFFO - Professeur Cyril SCHWEITZER

2^e sous-section : (Chirurgie infantile)

Professeur Pierre JOURNEAU - Professeur Jean-Louis LEMELLE

3^e sous-section : (Gynécologie-obstétrique ; gynécologie médicale)

Professeur Philippe JUDLIN - Professeur Olivier MOREL

4^e sous-section : (Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques ; gynécologie médicale)

Professeur Bruno GUERCI - Professeur Marc KLEIN - Professeur Georges WERYHA

55e Section : PATHOLOGIE DE LA TÊTE ET DU COU

1^{re} sous-section : (*Oto-rhino-laryngologie*)

Professeur Roger JANKOWSKI - Professeure Cécile PARIETTI-WINKLER

2^e sous-section : (*Ophthalmologie*)

Professeure Karine ANGIOI - Professeur Jean-Paul BERROD

3^e sous-section : (*Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie*)

Professeure Muriel BRIX

=====

PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS

61e Section : GÉNIE INFORMATIQUE, AUTOMATIQUE ET TRAITEMENT DU SIGNAL

Professeur Walter BLONDEL

64e Section : BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE

Professeure Sandrine BOSCHI-MULLER - Professeur Pascal REBOUL

65e Section : BIOLOGIE CELLULAIRE

Professeure Céline HUSELSTEIN

=====

PROFESSEUR ASSOCIÉ DE MÉDECINE GÉNÉRALE

Professeure associée Sophie SIEGRIST

Professeur associé Olivier BOUCHY

=====

MAÎTRES DE CONFÉRENCES DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS HOSPITALIERS

42e Section : MORPHOLOGIE ET MORPHOGENÈSE

1^{re} sous-section : (*Anatomie*)

Docteur Bruno GRIGNON

2^e sous-section : (*Histologie, embryologie, et cytogénétique*)

Docteure Isabelle KOSCINSKI

44e Section : BIOCHIMIE, BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE, PHYSIOLOGIE ET NUTRITION

1^{re} sous-section : (*Biochimie et biologie moléculaire*)

Docteure Shyue-Fang BATTAGLIA - Docteure Sophie FREMONT - Docteure Catherine MALAPLATE - Docteur Marc MERTEN -

Docteur Abderrahim OUSSALAH

2^e sous-section : (*Physiologie*)

Docteure Silvia DEMOULIN-ALEXIKOVA - Docteur Jacques JONAS

45e Section : MICROBIOLOGIE, MALADIES TRANSMISSIBLES ET HYGIÈNE

1^{re} sous-section : (*Bactériologie – Virologie ; hygiène hospitalière*)

Docteure Corentine ALAUZET - Docteure Hélène JEULIN - Docteure Véronique VENARD

2^e sous-section : (*Parasitologie et mycologie*)

Docteure Anne DEBOURGOGNE

46e Section : SANTÉ PUBLIQUE, ENVIRONNEMENT ET SOCIÉTÉ

1^{re} sous-section : (*Epidémiologie, économie de la santé et prévention*)

Docteur Cédric BAUMANN - Docteure Frédérique CLAUDOT - Docteur Alexis HAUTEMANIÈRE

Docteur Arnaud FLORENTIN (stagiaire)

2^e sous-section (*Médecine et Santé au Travail*)

Docteure Isabelle THAON

3^e sous-section (*Médecine légale et droit de la santé*)

Docteur Laurent MARTRILLE

47e Section : CANCÉROLOGIE, GÉNÉTIQUE, HÉMATOLOGIE, IMMUNOLOGIE

1^{re} sous-section : (*Hématologie ; transfusion*)

Docteur Julien BROSEUS – Docteure Maud D'AVENI

2^e sous-section : (*Cancérologie ; radiothérapie*)

Docteure Lina BOLOTINE

3^e sous-section : (*Immunologie*)

Docteure Alice AARNINK (stagiaire)

4^e sous-section : (*Génétique*)

Docteure Céline BONNET

48e Section : ANESTHÉSIOLOGIE, RÉANIMATION, MÉDECINE D'URGENCE, PHARMACOLOGIE ET THÉRAPEUTIQUE

1e sous-section : (*Anesthésiologie-réanimation et médecine péri-opératoire*)

Docteur Philippe GUERCI

2e sous-section : (*Médecine intensive-réanimation*)

Docteur Antoine KIMMOUN

3e sous-section : (*Pharmacologie fondamentale ; pharmacologie clinique ; addictologie*)

Docteur Nicolas GAMBIER - Docteure Françoise LAPICQUE - Docteur Julien SCALA-BERTOLA

49e Section : PATHOLOGIE NERVEUSE ET MUSCULAIRE, PATHOLOGIE MENTALE, HANDICAP ET RÉÉDUCATION

2e sous-section : (*Neurochirurgie*)

Docteur Fabien RECH (stagiaire)

3e sous-section : (*Psychiatrie d'adultes ; addictologie*)

Docteur Thomas SCHWITZER (stagiaire)

50e Section : PATHOLOGIE OSTÉO-ARTICULAIRE, DERMATOLOGIE ET CHIRURGIE PLASTIQUE

4e sous-section : (*Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique ; brûlologie*)

Docteure Laetitia GOFFINET-PLEUTRET

51e Section : PATHOLOGIE CARDIO-RESPIRATOIRE ET VASCULAIRE

3e sous-section : (*Chirurgie thoracique et cardio-vasculaire*)

Docteur Fabrice VANHUYSE

4e sous-section : (*Chirurgie vasculaire ; Médecine vasculaire*)

Docteure Nicla SETTEMBRE

52e Section : MALADIES DES APPAREILS DIGESTIF ET URINAIRE

1re sous-section : (*Gastroentérologie ; hépatologie ; addictologie*)

Docteur Anthony LOPEZ

2e sous-section : (*Chirurgie viscérale et digestive*)

Docteur Cyril PERRENOT

53e Section : MÉDECINE INTERNE, GÉRIATRIE ET MÉDECINE GÉNÉRALE

3e sous-section : (*Médecine générale*)

Docteure Kénora CHAU (stagiaire)

54e Section : DEVELOPPEMENT ET PATHOLOGIE DE L'ENFANT, GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE, ENDOCRINOLOGIE ET REPRODUCTION

4e sous-section : (*Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques ; Gynécologie médicale*)

Docteure Eva FEIGERLOVA

5e sous-section : (*Biologie et médecine du développement et de la reproduction ; gynécologie médicale*)

Docteur Mikaël AGOPIANTZ (stagiaire)

55e Section : PATHOLOGIE DE LA TÊTE ET DU COU

1re sous-section : (*Oto-Rhino-Laryngologie*)

Docteur Patrice GALLET

=====

MAÎTRES DE CONFÉRENCES

5e Section : SCIENCES ÉCONOMIQUES

Monsieur Vincent LHUILLIER

7e Section : SCIENCES DU LANGAGE : LINGUISTIQUE ET PHONETIQUE GENERALES

Madame Christine DA SILVA-GENEST

19e Section : SOCIOLOGIE, DÉMOGRAPHIE

Madame Joëlle KIVITS

64e Section : BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE

Madame Marie-Claire LANHERS - Monsieur Nick RAMALANJAONA

65e Section : BIOLOGIE CELLULAIRE

Madame Nathalie AUCHET - Madame Natalia DE ISLA-MARTINEZ - Monsieur Christophe NEMOS

66e Section : PHYSIOLOGIE

Monsieur Nguyen TRAN

69^e Section : NEUROSCIENCES

Madame Sylvie MULTON

=====

MAÎTRES DE CONFÉRENCES ASSOCIÉS DE MÉDECINE GÉNÉRALE

Docteur Cédric BERBE

=====

DOCTEURS HONORIS CAUSA

Professeur Charles A. BERRY (1982)
Centre de Médecine Préventive, Houston (U.S.A)
Professeur Pierre-Marie GALETTI (1982)
Brown University, Providence (U.S.A)
Professeure Mildred T. STAHLMAN (1982)
Vanderbilt University, Nashville (U.S.A)
Professeur Théodore H. SCHIEBLER (1989)
Institut d'Anatomie de Würzburg (R.F.A)
Professeur Mashaki KASHIWARA (1996)
Research Institute for Mathematical Sciences de Kyoto
(JAPON)

Professeure Maria DELIVORIA-PAPADOPOULOS
(1996) *Université de Pennsylvanie (U.S.A)*
Professeur Ralph GRÄSBECK (1996)
Université d'Helsinki (FINLANDE)
Professeur Duong Quang TRUNG (1997)
Université d'Hô Chi Minh-Ville (VIÊTNAM)
Professeur Daniel G. BICHET (2001)
Université de Montréal (Canada)
Professeur Marc LEVENSTON (2005)
Institute of Technology, Atlanta (USA)

Professeur Brian BURCHELL (2007)
Université de Dundee (Royaume-Uni)
Professeur Yunfeng ZHOU (2009)
Université de Wuhan (CHINE)
Professeur David ALPERS (2011)
Université de Washington (U.S.A)
Professeur Martin EXNER (2012)
Université de Bonn (ALLEMAGNE)

**À mon grand-père, qui je le sais n'aurait manqué ce jour pour rien au monde.
Merci de l'amour dont tu as abreuvé notre famille, merci pour le soutien indéfectible que tu as
toujours représenté, merci de cette vie formidable que tu nous as offerte, merci d'avoir tant
aimé la vivre.**

**À mon fils, qui me remplit d'amour et de fierté.
Tu entres dans une belle et grande famille, à laquelle tu apportes déjà tant de bonheur.**

REMERCIEMENTS

À mon Président de Jury, Monsieur le Professeur Cyril SCHWEITZER.

Professeur des Universités – Praticien Hospitalier

Vous me faites l'honneur de présider ce jury et de juger mon travail. Merci de votre bienveillance et de votre attention tout au long de mon parcours. Merci surtout d'avoir toujours pris le temps de me parler lorsque j'en avais besoin. Vos conseils ont guidé mes choix, votre optimisme m'a permis de croire en mes projets et de les voir plus grands. Je vous témoigne ma profonde reconnaissance.

À ma Directrice de Thèse, Madame le Professeur Justine BACCHETTA.

Professeur des Universités – Praticien Hospitalier

Vous m'avez fait confiance pour mener à bien ce travail. Je vous remercie pour votre gentillesse, votre patience et votre grande disponibilité. Travailler sous votre direction a été un réel plaisir. La passion qui vous anime est contagieuse et force l'admiration. Recevez ma sincère gratitude.

À Monsieur le Professeur Luc FRIMAT.

Professeur des Universités – Praticien Hospitalier

Vous me faites l'honneur d'apporter votre expertise à la critique de ce travail en faisant partie de mon jury de thèse. Acceptez pour cela mes plus sincères remerciements.

À Madame le Docteur Isabelle VRILLON.

Vous me faites l'honneur de juger mon travail et d'apporter votre expérience à sa critique. Merci de m'avoir transmis l'amour de cette belle discipline qu'est la Néphrologie, de m'avoir fait découvrir sa richesse et sa complexité. Recevez toute ma gratitude.

À Monsieur le Docteur Benjamin SAVENKOFF.

Vous me faites l'honneur et le grand plaisir de juger mon travail. Merci pour votre pédagogie, votre humour et votre enthousiasme permanent. On ne peut que progresser à votre contact, tant votre joie de transmettre est palpable. Recevez l'expression de ma profonde gratitude.

À Madame le Docteur Irma MACHUCA-GAYET.

Merci pour votre encadrement et votre confiance tout au long de ce travail. Vous m'avez transmis les savoirs nécessaires à chaque étape, avec beaucoup de patience et d'enthousiasme. Recevez toute ma reconnaissance.

À Camille, ma fiancée, la mère de mon fils, et bientôt mon épouse. Tu es mon présent et mon avenir. Nous avons déjà traversé bien des épreuves ensemble, et notre amour en est sorti grandi. J'ai hâte de découvrir à tes côtés tout ce que la vie nous réserve. Je t'aime.

À ma mère. Les pensées abondent mais les mots semblent dérisoires. Dire que je n'y serais pas arrivé sans toi serait bien peu. Tu as vécu chaque moment de tristesse, de doute et de joie au moins aussi intensément que moi. Merci de m'avoir transmis ta vocation. Merci d'être à mon écoute quoi qu'il arrive. Merci d'être toujours là pour nous. Je t'aime.

À Sarah et Julie. Quelle chance d'être votre grand frère. Le regard que vous posez sur moi m'emplit toujours d'une grande fierté. La complicité, les discussions et les rires que nous partageons à chaque retrouvaille font partie des grands moments de mon existence. Je vous aime.

À Patrick et Chantal. Merci pour votre soutien, vos mots et vos encouragements à chaque projet que j'entreprends. Merci aussi pour tous ces souvenirs que nous avons partagés. La découverte du Canada, tête première dans la neige, ou la houleuse traversée corse gavée de pistaches. Je vous aime.

À Vincent, Rachel, Paul, Mette, Alexandre, Stéphanie et leurs enfants. Mes cousins et cousines. Vous êtes toujours dans mon cœur et dans mes pensées. Quelle joie lorsque nous nous retrouvons. Que ce soit pour les grands moments de nos vies ou simplement pour partager un bon moment en famille. Je vous aime.

À mon père et à mon oncle. Mon « côté Quinaux » l'interdit mais tant pis, je vais déroger à notre accord tacite : je vous aime.

À ma grand-mère. Merci pour ces beaux souvenirs d'enfance, pour les bonbons dans le tiroir de la commode, pour la grande fierté que tu as toujours affichée vis-à-vis de tes petits-enfants. Je t'aime.

À Claude, Catherine, Léa et Pauline. Merci de m'avoir accueilli dans votre famille. À tous les bons moments que nous allons passer ensemble.

À nos amis Decam et Febbraro. Ceux qui m'ont vu grandir et ceux avec qui j'ai grandi. Mention spéciale à mon sauveur du Sénégal. Geoffroy, nous pouvons le dire : sans toi, rien de tout cela n'aurait été possible.

À Markus, mon ami de toujours. Nous avons vécu tant de choses ensemble depuis les années lycée, difficile de tout évoquer en quelques mots. Malgré la distance qui nous sépare depuis quelques temps, nous sommes toujours aussi proches. Sache que tu garderas toujours une place spéciale dans ma vie.

À Damien. La musique nous a réunis pour la première fois il y a plus de 15 ans et elle continue de nous unir aujourd'hui. À tous nos après-midis d'adolescents passés à jouer pendant des heures, et à nos discussions à n'en plus finir.

À Ardavan. Mon confident, mon seul et unique colocataire, l'homme qui m'a préparé à la vie de couple. Quoi que tu aies pu dire dans la préface de ta thèse, tu as presque toujours perdu à NBA2K. Mais avec beaucoup de classe et de panache, je dois le reconnaître.

À Clément. Tu m'as tendu la main le premier lorsque j'ai sauté le pas et quitté mon nid méridional. Tu m'as fait découvrir ton univers et m'y a aussitôt intégré, avec toute la générosité qui te caractérise. « You're the man ! »

À Arthur. À nos mercredis tennis, à nos soirées et leurs seaux de cocktails, à tous les engins que tu m'as prêtés et que j'ai pris soin de casser de manière toujours plus originale, à terre comme sur mer.

À Agathe. Lorsque nous nous sommes rencontrés, nous étions deux jeunes lycéens au tout début d'un long parcours. Et nous voilà aujourd'hui. Merci pour ton soutien et ton amitié toutes ces années.

À Alexandre, Monsieur Mas, l'espagnol. A toutes nos discussions métaphysiques, plus ou moins houleuses, plus ou moins courtoises. Vivement la prochaine, mon ami philosophe.

À Célia, ma marraine, celle qui m'a guidé sur le chemin de la vertu. Comment aurais-je fait sans toi ? Je préfère ne pas y penser.

À Valentine, le moteur de notre belle Moutre. Toujours d'attaque, toujours partante pour nous réunir. Merci de ton écoute à chacune de mes introspections et de tous ces rires partagés.

À Rémy. La force tranquille, que rien ne semble arrêter. Merci pour ton grand cœur, bien caché derrière un flegme légendaire.

À Manon, toujours émerveillée par mes super-pouvoirs lunaires. Merci d'être aussi bon public à mes pitreries involontaires, tu m'en rendrais presque fier.

À Laurie, dont je n'énumérerai pas les surnoms affectueux par soucis de place. Tu vois, le Grand Nord c'est pas mal finalement.

À Manu, Ricou, Gautier et FX. Les inséparables. À nos WEI, nos WES, nos galas. Et à nos journées BU et conférences nocturnes, toujours ponctuées de crises de rires difficilement contenues.

À Vincent et Céline, les purs niçois. Votre porte m'a toujours été ouverte lorsque j'en avais besoin. Votre soutien et vos conseils ont beaucoup compté pour moi.

À Julien, qui aura sans doute passé un autre doctorat d'ici à la lecture de ces quelques mots. Merci de tous ces grands moments musicaux avec Ivory.

À Charles, l'homme le plus caisse de l'univers (ex aequo). Merci de l'oreille attentive que tu m'as apportée dans les moments clefs et de ta grande sagesse.

À Grégoire, notre futur Doyen. Attrait naturel pour les sons saturés et amour de l'anatomie, de bonnes bases pour une amitié solide, non ?

À Camille et Guillaume, mes compagnons de rire et de boustifaille. Peut-on garder notre sérieux plus de cinq minutes ? Sans doute. Mais ça reste à prouver.

À Pierre-Olivier, le magnifique. Notre complicité serait presque excessive, tout comme notre amour de la langue française et de la cervoise.

À Cyprien, au moins aussi avide que moi de bonnes punchlines. À nos soirées cinéphiles et vidéoludiques, passées et à venir.

À Alexis. Merci pour toutes nos discussions de mélomanes et nos échanges de coups de cœur. Tu es le musicien le plus passionné que je connaisse.

À Mathieu et à Lucile, nos amis vosgiens érudits et uniques. Et à votre petite Alice, qui j'en suis sûr sera une grande compagnonne de jeu pour Samuel !

À Paul, Lisa Et Jules, et tous ces bons moments passés à préparer les soirées du Club. Courage, on finira par virer le président.

À Pauline et Ayham. Refaire le monde avec vous autour d'un bon millésime est toujours un moment incroyable.

À Jacques et Christina. Merci de m'avoir transmis votre passion sans borne pour la biologie. Merci pour ces repas que nous avons partagés, pour votre écoute et votre soutien.

À toutes les équipes de néphrologie et dialyse pédiatriques du CHU de Lyon. J'ai eu beaucoup de chance de travailler avec vous. Vous allez me manquer.

À l'équipe de néphrologie de Metz, merci pour ce stage de rêve que vous m'avez offert et qui a confirmé ma vocation. Je vous embrasse bien fort !

SERMENT

Au moment d'être admis à exercer la médecine, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité.

Mon premier souci sera de rétablir, de préserver ou de promouvoir la santé dans tous ses éléments, physiques et mentaux, individuels et sociaux.

Je respecterai toutes les personnes, leur autonomie et leur volonté, sans aucune discrimination selon leur état ou leurs convictions. J'interviendrai pour les protéger si elles sont affaiblies, vulnérables ou menacées dans leur intégrité ou leur dignité. Même sous la contrainte, je ne ferai pas usage de mes connaissances contre les lois de l'humanité.

J'informerai les patients des décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences. Je ne tromperai jamais leur confiance et n'exploiterai pas le pouvoir hérité des circonstances pour forcer les consciences.

Je donnerai mes soins à l'indigent et à quiconque me les demandera. Je ne me laisserai pas influencer par la soif du gain ou la recherche de la gloire.

Admis dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me seront confiés. Reçu à l'intérieur des maisons, je respecterai les secrets des foyers et ma conduite ne servira pas à corrompre les mœurs.

Je ferai tout pour soulager les souffrances. Je ne prolongerai pas abusivement les agonies. Je ne provoquerai jamais la mort délibérément.

Je préserverai l'indépendance nécessaire à l'accomplissement de ma mission. Je n'entreprendrai rien qui dépasse mes compétences. Je les entretiendrai et les perfectionnerai pour assurer au mieux les services qui me seront demandés.

J'apporterai mon aide à mes confrères ainsi qu'à leurs familles dans l'adversité. Que les hommes et mes confrères m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses ; que je sois déshonoré et méprisé si j'y manque.

TABLE DES MATIERES

ABREVIATIONS.....	3
INTRODUCTION.....	4
1. Bases moléculaires de la cystinose.....	5
2. Manifestations cliniques précoces de la cystinose.....	6
3. Rôle thérapeutique de la cystéamine dans la cystinose.....	6
4. Cystinose et atteinte osseuse (CMBD).....	7
5. Impact de la cystinose sur les cellules osseuses.....	8
6. Effets de la cystéamine sur les cellules osseuses.....	9
7. Implication de la galectine-3 dans la physiopathologie de la cystinose.....	10
8. Interaction de la cystinosine avec la voie mTOR.....	11
9. Le projet CYSTEА-BONE.....	11
ETUDE.....	13
Page titre.....	14
Résumé.....	15
Introduction.....	16
Matériels et méthodes.....	16
1. Protocole d'étude.....	16
2. Cultures primaires d'ostéoclastes humains.....	18
3. Reverse Transcription et PCR quantitative.....	18
4. Analyse statistique.....	19
5. Considérations éthiques.....	18
RESULTATS.....	20
Atteinte osseuse de la cystinose : une complication tardive.....	20
La cystéamine à forte dose atténue la propension des cellules mononucléées dérivées de patients à générer des ostéoclastes.....	20
L'impact de la cystéamine sur le profil d'expression ARN des ostéoclastes de patients dépend de sa concentration.....	21
L'impact de la cystéamine sur le processus de différenciation ostéoclastique varie selon le génotype des patients.....	21

DISCUSSION.....	22
Principaux résultats.....	22
Implications cliniques.....	22
Contextualisation.....	23
Expression ARN au sein des ostéoclastes.....	23
Galectine-3 et cystinose.....	24
Association génotype-phénotype.....	25
Hypothèse proposée.....	25
CONCLUSION.....	27
REFERENCES.....	28

ANNEXES

Tableau 1.....	32
Tableau 2.....	33
Tableau 3.....	34
Figure 1.....	35
Figure 2.....	36
Figure 3.....	37
Figure 4.....	38
Figure 5.....	39
Figure 6.....	40

ABREVIATIONS

ADN: Acide désoxyribonucléique

ARN: Acide ribonucléique

CKD-MBD: *Chronic Kidney Disease-associated Mineral and Bone Disorders*

CMBD: *Cystinosis Metabolic Bone Disease*

CRD: *Carbohydrate Recognition Domain*

CTNS / Ctns: Gène codant pour la protéine cystinosine chez l'humain / la souris

Ctns^{-/-}: gène Ctns murin invalidé

DDCt: *Delta-Delta-Cycle threshold*

KO: *Knock-out*

LGALS3 / Lgals3: Gène codant pour la protéine galectine-3 chez l'humain / la souris

M-CSF: *Monocyte Colony Stimulating Factor*

mTOR: *mechanistic Target Of Rapamycin*

mTORC1: *mechanistic Target Of Rapamycin Complex 1*

OB: Ostéoblastes

OC: Ostéoclastes

qPCR: PCR quantitative ou PCR en temps réel

RANK-L: *Receptor Activator of NFkB - Ligand*

rhGH: *recombinant human Growth Hormone*

TSC1 : *Tuberous Sclerosis Complex 1*

TRAP / TRAcP: *Tartrate Resistant Acid Phosphatase*

WT: *Wild Type*

INTRODUCTION

1. Bases moléculaires de la cystinose

La cystinose est une maladie de surcharge lysosomale monogénique autosomique récessive à pénétrance complète, causée par la mutation bi-allélique du gène CTNS (17p13.2), possédant 12 exons [1]. Son ARNm de 2,6 kb code pour la cystinosine, un transporteur de cystine lysosomal de 367 acides aminés avec sept domaines transmembranaires.

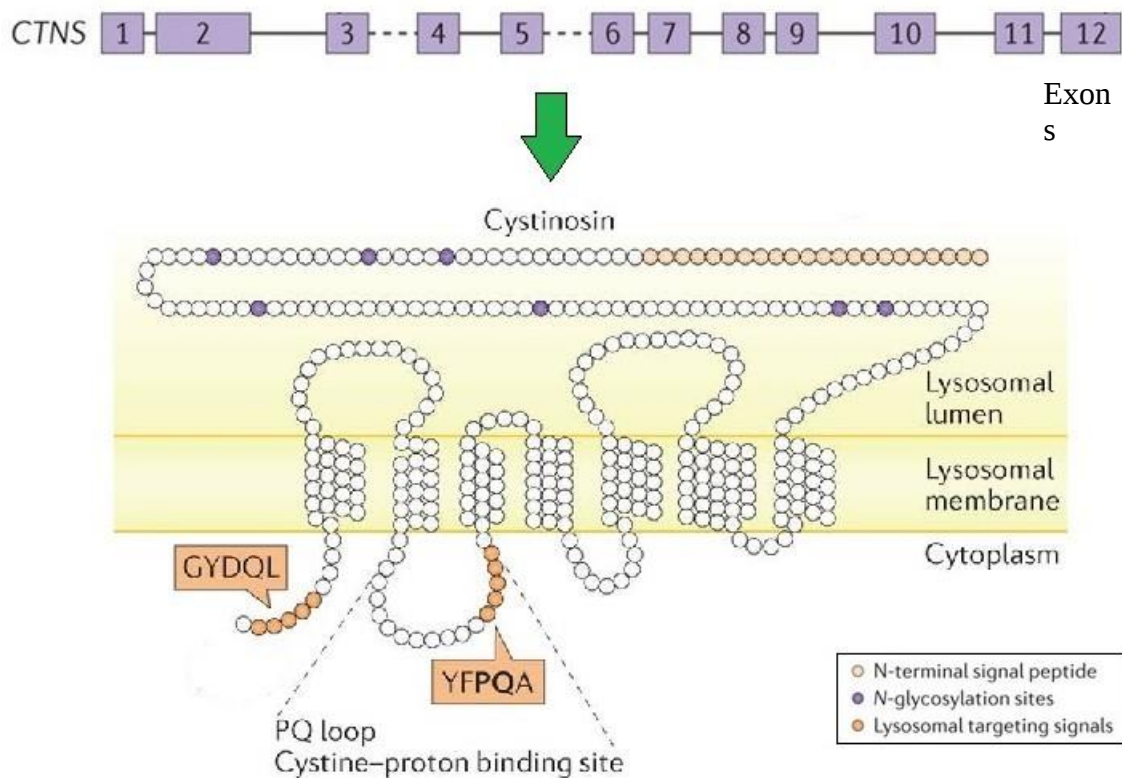


Figure d'après Cherqui, S. & Courtoy, P. J. "The renal Fanconi syndrome in cystinosis: pathogenic insights and therapeutic perspectives". *Nat Rev Nephrol* 13, 115–131 (2017)

Jusqu'à présent, plus de 140 mutations pathogènes ont été rapportées dans la littérature. Celle qui est le plus fréquemment retrouvée est une large délétion de 57 kb - impliquant les 9 premiers exons du gène CTNS et une partie de l'exon 10 - détectée chez environ 50% des allèles mutants de patients d'origine nord-européenne et nord-américaine. En dehors de cette distribution géographique, la mutation est presque totalement absente. Les autres mutations décrites incluent délétions, petites insertions, duplications, faux-sens, non-sens, mutations des sites

d'épissage, mutations dans la séquence du promoteur et réarrangements génomiques. Ce sont les mutations tronquantes sévères atteignant les deux allèles du gène qui sont généralement associées à la forme grave infantile de la maladie [2, 3].

2. Manifestations cliniques précoces de la cystinose

Le déficit en cystinosine entraîne l'accumulation de cystine dans tous les organes et tissus. Dans la forme la plus courante, dite cystinose « néphropathique », les nourrissons présentent un dysfonctionnement généralisé du tubule proximal [4] (syndrome de Fanconi) caractérisé par d'importantes pertes urinaires d'électrolytes, de minéraux, de bicarbonate, de glucose, d'acides aminés, d'eau et d'autres micromolécules. Les manifestations cliniques précoces comprennent par conséquent syndrome polyuro-polydipsique, retard de croissance et rachitisme hypophosphatémique [5].

3. Rôle thérapeutique de la cystéamine dans la cystinose

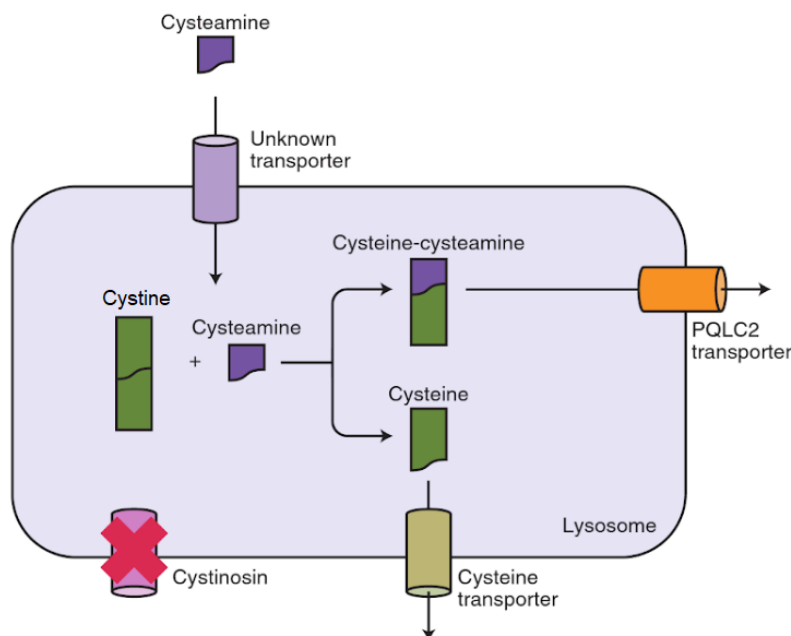


Figure d'après Geary, D.F. & Schaefer, F.
"Pediatric Kidney Disease". Springer, 2017.

Le rôle bénéfique de la thérapie par cystéamine sur la fonction rénale des sujets atteints de cystinose est connu depuis plus de 25 ans [6]. Les mécanismes qui sous-tendent cet effet thérapeutique ont néanmoins été élucidés plus tardivement [7]. La cystéamine pénètre dans le lysosome et rompt la liaison disulfure au sein de la cystine, entraînant la formation de cystéine et d'un disulfure de cystéamine. Ceux-ci peuvent alors quitter le lysosome par le transporteur de la cystéine et PQLC2, respectivement. La cystéamine permet donc l'épuration de la cystine accumulée dans le lysosome en réagissant avec cette dernière, les produits de la réaction pouvant par la suite shunter le transporteur déficient.

Il est à noter que le traitement oral par cystéamine n'améliore pas le syndrome de Fanconi. En revanche, il ralentit considérablement la progression des lésions rénales [6, 8], retarde la nécessité d'une transplantation [9, 10, 11], améliore le pronostic statural et prévient la survenue des complications tardives de la maladie [12].

4. Cystinose et atteinte osseuse (CMBD)

Chez l'adolescent ou le jeune adulte atteints de cystinose, on note l'apparition de troubles minéraux et osseux, initialement attribués à la seule progression de l'insuffisance rénale chronique (*CKD-MBD : Chronic Kidney Disease associated Mineral and Bone Disorders*). L'efficacité de la thérapie par cystéamine quant au maintien de la fonction rénale a permis de constater qu'en réalité, l'atteinte osseuse survient indépendamment du degré d'insuffisance rénale, bien que cette dernière puisse participer à la détérioration du capital osseux. Par ailleurs, la mise en place rapide d'une supplémentation adaptée permet de pallier les pertes urinaires liées à la tubulopathie. Outre le syndrome de Fanconi précoce et l'insuffisance rénale chronique plus tardive, d'autres complications décrites dans la littérature peuvent contribuer au phénotype osseux observé chez les patients atteints de cystinose : déficits ostéoblastique et ostéoclastique

primaires, dysfonctions endocriniennes multiples, traitement par glucocorticoïdes post-transplantation rénale [13], toxicité de la cystéamine [14]. Cette atteinte osseuse multifactorielle est à l'origine d'un phénotype complexe de description récente, baptisé CMBD (*Cystinosis Metabolic Bone Disease*). Les principales manifestations cliniques associées à la CMBD - fractures, déformations et/ou douleurs osseuses [15] - touchent en effet jusqu'à 70% des patients cystinotiques atteignant l'adolescence ou entrant dans l'âge adulte [16]. Du fait de cette prévalence importante chez l'adulte jeune et de l'accroissement de l'espérance de vie liée au traitement par cystéamine, des recommandations internationales ont été publiées en 2019 [17].

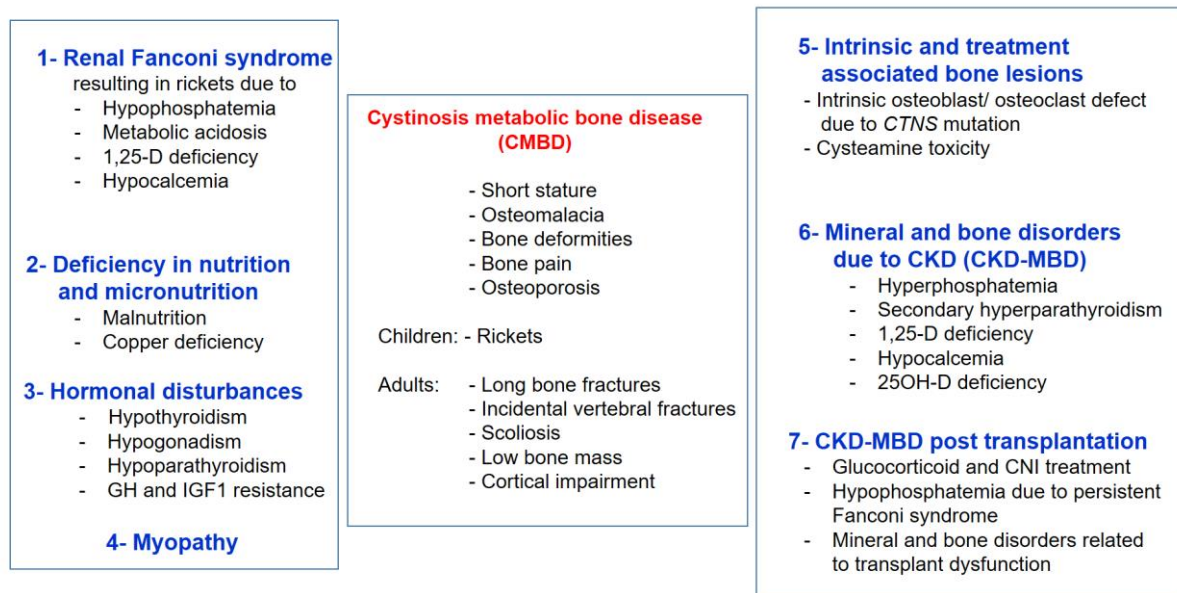


Figure d'après Hohenfellner et al. "Management of bone disease in cystinosis: an international consensus statement" *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 2019

5. Impact de la cystinose sur les cellules osseuses

L'un des moyens d'aborder les bases moléculaires de cette pathologie a été de générer un modèle murin de cystinose par invalidation complète du gène *Ctns*. L'invalidation du gène *Ctns* chez les souris n'entraîne pas de syndrome de Fanconi complet. Pourtant, les souris invalidées présentent une ostéopénie avérée avec diminution de la minéralisation et de l'épaisseur

corticale, soulevant l'hypothèse d'un défaut osseux sous-jacent spécifique dans la cystinose [18].

Chez l'humain, la capacité *in vitro* des cellules souches mésenchymateuses (CSM) isolées de la moelle osseuse à se différencier au sein de la lignée ostéoblastique est réduite chez les patients atteints de cystinose, par rapport aux cellules provenant de contrôles sains [19].

L'étude du phénotype osseux chez la souris révèle une réduction de la densité minérale osseuse, du volume trabéculaire, du nombre et de l'épaisseur des travées osseuses chez les sujets invalidés pour le gène *Ctns* par rapport aux sujets contrôles. Ces modifications sont associées à une réduction du nombre des ostéoclastes et des ostéoblastes au sein du tissu osseux, ainsi qu'à une réduction des marqueurs plasmatiques du remodelage osseux (P1NP et TRAcP). *In vitro*, l'inactivation du gène *Ctns* réduit la capacité des précurseurs ostéoblastiques à se transformer en ostéoblastes matures aptes à synthétiser la matrice ostéoïde, et des précurseurs ostéoclastiques à se transformer en ostéoclastes matures aptes à la résorption osseuse [20].

Notre équipe a été la première à montrer, sur des cellules humaines issues de sept patients cystinotiques et témoins appariés, que l'expression du gène CTNS est régulée au cours de la différenciation ostéoclastique, pour atteindre un maximum d'expression dans l'ostéoclaste mature. La mutation du gène CTNS présente donc un impact potentiel sur l'ostéoclastogénèse [21]. Il a ultérieurement été démontré que l'expression du gène CTNS est nécessaire à la différenciation ostéoblastique, durant laquelle l'expression du gène CTNS augmente également [20].

6. Effets de la cystéamine sur les cellules osseuses

In vitro, la cystéamine stimule la différenciation ostéoblastique et l'activité de minéralisation des ostéoblastes murins sains lorsqu'elle est administrée à dose faible (50 μ M). En revanche,

il apparaît qu'à des doses plus élevées (200 μ M) la cystéamine possède un effet inhibiteur sur la différenciation des ostéoblastes et leurs capacités de minéralisation [21].

Par ailleurs, la cystéamine présente également à faible dose des effets anti-résorptifs bénéfiques sur les ostéoclastes sains d'origine humaine et peut corriger en partie le dysfonctionnement ostéoclastique induit par les mutations du gène CTNS chez les patients atteints de cystinose néphropathique [21].

Ces données expérimentales corroborent les observations cliniques et pourraient expliquer, en partie au moins, la toxicité osseuse observée chez les patients traités par de fortes doses de cystéamine [14].

7. Implication de la galectine-3 dans la physiopathologie de la cystinose

La galectine-3 est une protéine de la famille des lectines codée par le gène LGALS3, contenant un domaine de reconnaissance des carbohydrates (CRD) qui permet la liaison spécifique des β -galactosides. Elle possède un rôle dans de nombreux processus biologiques tels que l'adhésion cellulaire, les interactions cellule-matrice, l'activation des cellules immunitaires, la différenciation et la croissance cellulaire ou l'apoptose.

Il a récemment été démontré que la cystinosine renforce la localisation lysosomale et la dégradation de la galectine-3 [22]. On note par conséquent une surexpression rénale de la galectine-3 chez la souris *Ctns*^{-/-}, tandis que l'absence de galectine-3 chez les souris cystinotiques (*double knock-out*) améliore la fonction et l'architecture rénale tout en diminuant l'infiltration macrophagique du parenchyme par rapport aux souris *Ctns*^{-/-}. Ces données suggèrent fortement que la galectine-3 participe à l'inflammation impliquée dans la progression de l'insuffisance rénale dans la cystinose.

Il a par ailleurs été démontré dans un modèle murin que l'invalidation du gène LGALS3 entraîne une altération de la différenciation terminale des cellules osseuses, une diminution des capacités de minéralisation des ostéoblastes et une réduction de l'activité de résorption des ostéoclastes. L'observation du phénotype des souris invalidées met en évidence une formation osseuse atténuée, une résorption osseuse accrue, une accélération de la perte trabéculaire liée à l'âge et une solidité osseuse altérée [23]. Cette résorption accrue malgré l'activité ostéoclastique réduite pourrait être expliquée par l'inflammation osseuse (augmentation de l'expression des cytokines inflammatoires Il6 et Il1 β chez les souris *Lgals3^{-/-}*), potentiellement responsable d'une perturbation des signaux de coordination du couplage ostéoblastes / ostéoclastes.

Il apparaît à travers ce modèle murin de *knockout* que la galectine-3 joue un rôle dans l'homéostasie osseuse et dans le dialogue entre ostéoblastes et ostéoclastes. En effet, *in vitro*, la galectine-3 est sécrétée par les ostéoblastes et inhibe l'ostéoclastogénèse, participant ainsi au maintien de l'homéostasie trabéculaire indépendamment de l'axe RANKL/OPG [24].

Il est donc intéressant d'émettre l'hypothèse que l'expression de la galectine-3 est également dérégulée au sein des cellules osseuses en situation de cystinose, participant à l'altération du phénotype osseux.

8. Interaction de la cystinosine avec la voie mTOR

L'étude de cellules rénales tubulaires proximales obtenues de donneurs sains et de patients atteints de cystinose révèle que le déficit en cystinosine est associé à une signalisation mTORC1 perturbée, caractérisée par une rétention lysosomale anormale de mTORC1 pendant la privation de nutriments (*starving*), suivie d'une réactivation retardée [25]. L'altération de la voie de signalisation mTORC1 peut donc participer au développement de la dysfonction tubulaire

proximale qui caractérise la cystinose néphropathique et n'est pas résolue par l'administration de cystéamine.

Par ailleurs, mTORC1 joue un rôle important dans le développement squelettique et le remodelage osseux. En effet, ce complexe est impliqué dans la régulation de la différenciation ostéoblastique [26, 27] mais aussi de la différenciation ostéoclastique [28, 29].

La voie mTORC1 pourrait donc être impliquée dans l'atteinte osseuse des patients atteints de cystinose.

9. Le projet CYSTEABONE

Le projet CYSTEABONE a pour objectif d'améliorer notre compréhension de la pathologie osseuse associée à la cystinose et de mettre en avant les mécanismes impliqués dans la toxicité osseuse de la cystéamine. Il s'agit d'un projet global axé sur 3 objectifs principaux.

Objectif spécifique n°1 : Evaluer expérimentalement si et comment la déficience en cystinosine et la thérapie par cystéamine impactent le cross-talk entre les ostéoblastes et les ostéoclastes dans un modèle murin.

Objectif spécifique n°2 : Analyse génotype / phénotype en termes de différenciation ostéoclastique et de réponse à la thérapie par cystéamine chez l'humain, par le biais d'échantillons provenant de différents centres européens.

Objectif spécifique n°3 : Confirmation de la toxicité osseuse de la cystéamine à travers un modèle animal original (poisson zèbre).

Le travail réalisé dans le cadre de cette thèse concerne le deuxième objectif alors que le travail réalisé dans le cadre du master II correspondait au premier objectif.

ETUDE

Osteoclasts obtained from patients with nephropathic cystinosis with residual cystinosis activity display a peculiar sensitivity to cysteamine

Thomas Quinaux¹⁻², Aurélie Bertholet-Thomas¹⁻², Georges Deschenes³, Olivia Boyer⁴, Aris Pongas⁵, Sandrine Lemoine⁶, Aude Servais⁷, Ségolène Gaillard⁸, Diane Platel², Cécile Acquaviva-Bourdain⁹, Irma Machuca-Gayet^{2*}, Justine Bacchetta^{1,2,10*}

- 1- Centre de Référence des Maladies Rénales Rares, Centre de Référence des Maladies Rares du Calcium et du Phosphore, Hôpital Femme Mère Enfant, Bron, France
- 2- INSERM 1033 Research Unit, Lyon, France
- 3- Service de Néphrologie, APHP-Hôpital Robert Debré, Paris, France
- 4- Néphrologie Pédiatrique, Centre de Référence des Maladies Rénales Héritaires de l'Enfant et de l'Adulte (MARHEA), Hôpital Necker-Enfants Malades, AP-HP, Paris, France
- 5- Service de Néphrologie Dialyse et Transplantation pédiatriques, Hôpital d'Enfants, CHRU de Nancy, France
- 6- Hospices Civils de Lyon, Service de Néphrologie, Dialyse et Hypertension Artérielle, Hôpital Edouard Herriot, Lyon, France
- 7- Service de Néphrologie adulte, Hôpital Necker, Paris, France
- 8- Hospices civils de Lyon, EPICIME-CIC 1407, INSERM, Department of Clinical Epidemiology, CHU-Lyon, Bron, France
- 9- CHU de Lyon, HCL, Service de Biochimie et Biologie Moléculaire, Unité Maladies Héritaires du Métabolisme, Bron, France
- 10- Université de Lyon, Lyon, France

* : these authors equally contributed to the manuscript

Corresponding author

Justine Bacchetta, MD, PhD
Hôpital Femme Mère Enfant
Boulevard Pinel, 69677 Bron Cedex, France
justine.bacchetta@chu-lyon.fr
Tel: +33 4 27 85 61 30 Fax: +33 4 27 85 67 68
ORCID number: 0000-0002-0578-2529

Disclosure of interests

None to declare

Financial support

JB and IMG received a research grant from the Cystinosis Research Foundation for the CYSTEABONE project. TQ received a personal grant from the *Agence Régionale de Santé Grand Est (Année Recherche Fellowship)*.

Running title

Osteoclastic biology and nephropathic cystinosis

Abstract

Introduction

Cystinosis is an inherited metabolic disorder caused by the lysosomal accumulation of cystine. Bone complications of this disease have been described recently. The main objectives of this study were to determine *in vitro* the impact of *CTNS* mutations and cysteamine therapy on human osteoclasts and to carry out a genotype-phenotype analysis in terms of osteoclastic differentiation and response to cysteamine therapy.

Methods

Human osteoclasts were differentiated from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of 17 patients from several French centers. Cells were treated with increasing doses of cysteamine - 0 μ M, 50 μ M, 200 μ M - and then assessed for osteoclastic differentiation and RNA expression profile.

Results

High dose cysteamine (200 μ M) decreases the propensity of patients-derived mononuclear progenitors to generate osteoclasts. Interestingly, monocyte progenitors from patients with residual cystinosis activity show a peculiar sensitivity to cysteamine, which displays a biphasic effect on these progenitors depending on its concentration (50 vs. 200 μ M). Cysteamine also has a significant impact on the RNA expression profile of patients' osteoclasts, which varies according to its concentration.

Conclusion

The effect of cysteamine on bone metabolism depends on several factors, including the concentration at which it is administered and the genotype of treated patients. High dose cysteamine decreases the propensity of patients-derived mononuclear progenitors to generate osteoclasts, whatever their genotype. However, the study of genotype/phenotype correlations highlights a link between genotype and osteoclastic response to various concentrations of cysteamine in humans. These findings constitute a first step towards the implementation of personalized medicine in cystinosis, according to the genetic background of each patient.

Key words : Cystinosis, Cysteamine, Bone, Osteoclast, Genotype

INTRODUCTION

Nephropathic cystinosis (NC; 1/200 000 live births) is a monogenic autosomal recessive lysosomal storage disease (LSD) caused by a bi-allelic mutation of the *CTNS* gene (17p13.2), consisting of 12 exons [1]. This gene codes for cystinosin, a lysosomal seven transmembrane domains cystine transporter of 367 amino acids. So far, over 140 pathogenic mutations of the *CTNS* gene have been reported [3], the most frequent one being a large deletion of 57 kb involving the first 9 exons and part of exon 10. This deletion represents approximately 50% of mutant alleles in patients of North European and North American origin.

Cystinosin deficiency causes cystine to accumulate in all organs and tissues, making cystinosis a systemic disease [2]. Early clinical manifestations are related to complete proximal tubulopathy and therefore include polyuric-polydipsic syndrome, growth retardation and hypophosphatemic rickets. Natural history of this disorder is marked by chronic interstitial nephritis, leading to end stage kidney disease (ESKD) by the first decade of life. In this regard, the beneficial role of cysteamine therapy in NC has been well known for nearly three decades: although it does not improve tubulopathy, it considerably slows the progression of renal lesions [6, 8], delays the need for transplantation [9, 10, 11], and prevents late complications [12].

Since patient survival has improved considerably with cysteamine therapy, bone involvement has recently been described as a complication of NC arising around teenage and early adulthood [16]. It has been shown that altered bone phenotype in NC is related to impaired osteoblastic as well as osteoclastic function, both in murine models of cystinosis and cystinosis patients. Furthermore, recent experimental data corroborate clinical observations suggesting a toxicity of high dose cysteamine on bone cells [18-20]. The objectives of the present study were to determine *in vitro* the impact of *CTNS* mutations and cysteamine therapy on bone cells (namely, human osteoclasts derived from peripheral blood mononuclear cells), and to carry out a genotype-phenotype analysis in terms of osteoclastic differentiation and response to cysteamine therapy.

METHODS

1. Study protocol

We carried out a French prospective multicenter clinical study, the CYSTEAMINE-BONE project, to evaluate the impact of cysteamine on human osteoclasts. The main objective of this clinical study was to evaluate the impact of cysteamine on osteoclastic differentiation in patients with cystinosis, depending on the underlying genotype. The secondary objective was to describe the clinical bone status of patients with cystinosis. Inclusion criteria were the following: subjects older than 2 years of age, confirmed diagnosis of nephropathic cystinosis, ongoing oral cysteamine therapy at inclusion. Study protocol provided for the collection a sample of appropriate blood volume, in addition to the routine biological follow-up, in order to conduct osteoclastic differentiation analyzes. In parallel, clinical and biological data were collected.

Clinical data were as follows: current age (date of visit and date of birth), age at diagnosis (date of diagnosis), renal status (conservative treatment, dialysis, renal transplant), date(s) of dialysis initiation / renal transplantation(s), body weight and height, daily dose of cysteamine, current treatment with growth hormone (rhGH), type of immunosuppression if any (in particular, average dose of corticosteroids in the year preceding the study and type of immunosuppressants), characterization of genetic mutation(s) and clinical bone symptoms - *i.e.* history of fracture(s) with date of occurrence, topography and exact mechanism, bone pain and bone deformities with topography and details concerning orthopedic surgery, if needed. Biological data were as follows : plasma creatinine and estimated glomerular filtration rate (eGFR), plasma concentration of calcium, phosphate, total alkaline phosphatase, parathyroid hormone (PTH) and 25-hydroxyvitamin D, average concentration of intraleucocytic hemicystin in the past year.

The objective was to carry out a genotype / phenotype analysis of the impact of the different *CTNS* mutations, focused on osteoclastic differentiation with and without cysteamine. *CTNS* mutations were separated into groups, according to the previously published genetic data [1, 30-34]. We distinguished three genotypic groups: those that led to the synthesis of a cystinosin variant with residual cystin efflux activity (RA, residual activity), those that led to the synthesis of an inactive cystinosin variant (IP, inactive protein) and those that did not allow for the protein to be translated and present at the lysosome membrane (AP, absent protein).

2. Primary cultures of human osteoclasts

As previously published [21], mononuclear cells were purified from peripheral blood. Available blood volume varied according to the age and weight of subjects depending on the French law on clinical research. Blood samples were drawn before the administration of cysteamine, whose plasmatic concentration was therefore residual. After collection, blood was loaded onto a lymphocyte separation medium (Eurobio, Courtaboeuf, France) and fractionated in a density gradient in order to purify peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). PBMCs were then seeded in 96 wells plates at a density of 10^5 cells / well and cultured in minimum essential medium (Gibco Life Technologies, Grand Island, NY, USA) supplemented with 2 mM L-glutamine (Gibco Life Technologies), 1% penicillin / streptomycin (Gibco Life Technologies) and 10% fetal bovine serum (FBS; Dominique Dutscher, Brumath, France). Osteoclasts were obtained by incubating PBMCs with M-CSF at 20 ng/ml (PeproTech, Rocky Hill, New Jersey, USA) and RANKL at 40 ng/ml (PeproTech) from day 1 to terminal differentiation. By day 3, osteoclast precursors were treated with increasing doses of cysteamine during differentiation : 0 (baseline conditions), 50 and 200 μ M. At the end of the osteoclast differentiation protocol, cells were collected in Trizol reagent (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) for real-time PCR analysis or fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) and submitted to histochemical staining using a TRAP staining kit, in accordance with the manufacturer's instructions (Sigma-Aldrich,

St. Louis, MO, USA). Positively labeled cells with over 3 nuclei were then counted to assess *in vitro* osteoclastic differentiation of PBMCs.

3. Reverse Transcription and quantitative PCR (qPCR)

RNA isolation and purification were carried out from cell extracts preserved in TRIzol reagent according to the instructions of the manufacturer (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific), and followed by a DNase / RNase-Free column treatment (Macherey-Nagel) ; complementary DNA (cDNA) synthesis was performed with iScript reverse transcriptase for real-time quantitative PCR (qPCR) (Bio-Rad Laboratories, Marnes-la-Coquette, France). qPCRs were performed using the iTaq Universal SYBR Green Supermix and the RealTime CFX connect system (Bio-Rad Laboratories) for amplification cycles. Systematic checks were generated without iScript and amplified. qPCR was performed in duplicate for each data point. Gene expression was quantified and normalized with respect to the corresponding GAPDH RNA value and expressed by the DD_{Ct} method.

The primer sequences used for the analyses were as follows : 5'-TGTGTTCTGCTGTGTTGCTC-3' and 5'-TCCCAAGATGACGATCCCTG-3' for human DC-STAMP (Dendritic Cell-Specific Transmembrane Protein) ; 5'-ACCGGGGTATTGACTCTGAA-3' and 5'-GAGGTCAGGCTTGCATCAAT-3' for human CTSK (Cathepsin K) ; 5'-ACGAGCGGAAAATGGCAGA-3' and 5'-GATAGGAAGCCCCTGGGTAGC-3' for human GAL-3 (Galectin-3) ; 5'-GACAGTCAGCCGCATCTTCT-3' and 5'-ACCAAATCCGTTGACTCCGA-3' for human GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase).

4. Statistical analyses

Clinical and biological data in patients are presented as median (Q1-Q3). Comparison between groups for these criteria was performed using a Chi-square test. Data concerning osteoclastic differentiation were presented as mean number of osteoclasts per well $\pm$ standard error of the

mean (SEM). Values collected under different cell culture conditions were compared using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's post hoc test for multiple comparisons. Data concerning RNA expression levels (relative to GAPDH) were presented as mean expression level $\pm$ standard error of the mean (SEM). Mann-Whitney test was then used to compare RNA expression levels under different cell culture conditions. We used Wilcoxon matched-pairs signed rank test when comparing RNA expression levels at 50 and 200 μ M of cysteamine relative to baseline. Data regarding osteoclastic differentiation of mononuclear progenitors according to their genotype, at various cysteamine concentrations, were compared using the Mann-Whitney test. A result with $p < 0.05$ was considered significant. Analyses were performed using the PRISM 5 software.

5. Ethical considerations

The CYSTEABONE study (NCT03919981) was approved by the *Comité de Protection des Personnes Sud-Méditerranée IV* (2019-A00166-51). All patients and/or parents gave informed oral consent (Jardé type 3 protocol by French law).

RESULTS

Seventeen patients suffering from nephropathic cystinosis, of which 9 females, were included in this study, from five different healthcare centers in Lyon (pediatric nephrology and nephrology), Paris (Necker pediatric nephrology, Necker nephrology, Robert Debré pediatric nephrology) and Nancy (pediatric nephrology). Patients' baseline characteristics, including details regarding mutations of the *CTNS* gene and involved exons, are summarized in **Table 1**. Most subjects were pediatric patients, with a median age of 14 (7 - 18) years, and a median eGFR of 64 (50 - 105) ml/min per 1.73m². Their median cysteamine daily dose and leukocyte hemicystin concentration were 1240 (990 - 1630) mg/m² and 1.1 (1.0 - 1.7) nmol/g of proteins,

respectively. Most patients (71%) were under conservative kidney management (CKM). Five of them were kidney transplant recipients (29%).

Bone involvement in cystinosis: a late onset complication

We distinguished 2 groups of patients according to their renal management: CKM or renal transplant (**Table 2**). Patients under CKM were significantly younger than transplant recipients. In these young patients, bone symptoms of any kind were significantly less common than in older transplant patients (33% versus 80% respectively, $p = 0.04$), although GFR, leukocyte hemicystin levels and average daily dose of cysteamine per body surface area did not differ significantly between the two groups. Biological data on bone and phosphate/calcium metabolism did not differ significantly with renal management modality.

High dose cysteamine decreases the propensity of patients-derived mononuclear progenitors to generate osteoclasts

Results of *in vitro* osteoclastic differentiation with different cysteamine concentrations are summarized in **Table 3**. A decrease of TRAP positive multinucleated cells was noted in cultures with high doses of cysteamine (200 μM), in comparison with cultures at baseline conditions and cultures conducted with a low dose of cysteamine (50 μM) (**Figure 1**). These observations were made although all osteoclastic cultures were generated from the same number of monocyte progenitors. These findings indicate that, at a high dosage, cysteamine decreases the propensity of patients-derived mononuclear progenitors to generate osteoclasts.

We then sought to determine the percentage of high nuclei number (over 10 nuclei) TRAP positive cells, in order to assess the impact of cysteamine treatment on osteoclast multinucleation in patients. Regarding this outcome, no significant difference was found between baseline conditions, low dose (50 μM) and high dose (200 μM) cysteamine (**Figure 2**).

Impact of cysteamine on RNA expression in patients' osteoclasts depends on its concentration

In parallel with the study of results in terms of differentiation, we evaluated the impact of cysteamine at its different concentrations on the transcriptional profile of osteoclasts from healthy controls and cystinosis patients (**Figure 3**). Precisely, we determined the mRNA expression levels of early and late osteoclast-specific markers: DC-STAMP (Dendritic Cell-Specific Transmembrane Protein) and CTSK (Cathepsin K), respectively. Moreover, we looked at the expression levels of a protein known to be involved in bone homeostasis, which accumulates in cystinosis patients' cells due to defective lysosomal degradation: galectin-3 (GAL-3). At baseline conditions, mRNA expression of DC-STAMP and CTSK, as well as GAL-3, was significantly increased in osteoclasts generated from patients' PBMCs (*column B*). The expression profile of these markers, according to the dose of cysteamine, evolved differently between healthy controls and patients.

In healthy donors, mRNA expression of DC-STAMP and CTSK increased with cysteamine's concentration in the culture medium, seemingly in a dose-dependent manner, while the mRNA expression of GAL-3 decreased significantly at 200 μ M of cysteamine in comparison with other culture conditions. In patients with NC, the expression profiles of DC-STAMP and CTSK followed a mirror evolution: mRNA expression of DC-STAMP peaked at 50 μ M, whilst mRNA expression of CTSK bottomed at the same concentration. On the other hand, mRNA expression of GAL-3 increased in parallel with cysteamine concentration in the medium, in a dose-dependent manner.

Impact of cysteamine on osteoclastic differentiation varies according to patients' genotype

Last, we performed a genotype / phenotype analysis in terms of osteoclastic differentiation of monocyte progenitors from cystinosis patients (**Figure 4**). For this purpose, patients were divided into groups according to the impact of their DNA mutations on the translated protein,

cystinosis. At baseline conditions, the number of osteoclasts was significantly higher in the IP and AP groups than it was in the RA group. In these two groups (IP and AP), the number of osteoclasts obtained in cultures dropped alongside with the increase in cysteamine concentration, in a dose-dependent manner. On the other hand, in the RA group, we observed a moderate increase in the mean osteoclast number per well at 50 μ M of cysteamine, in contrast with a significant decrease at 200 μ M. Indeed, the decrease in osteoclast number at 200 μ M of cysteamine was more pronounced in the RA group than it was in the other two groups. These last observations indicate a peculiar sensitivity to cysteamine of monocyte progenitors from patients with residual cystinosis activity. They also highlight a biphasic effect of cysteamine on these progenitors, depending on its concentration.

DISCUSSION

Main findings

The main findings of the present study are the following: 1/ high dose cysteamine decreases the propensity of patients-derived mononuclear progenitors to generate osteoclasts, 2/ *CTNS* mutations alter the RNA expression profile of patients' osteoclasts compared to control subjects, 3/ cysteamine has a significant impact on the RNA expression profile of patients' osteoclasts which varies with its concentration and 4/ monocyte progenitors from patients with residual cystinosis activity show a peculiar sensitivity to cysteamine, which displays a biphasic effect on these progenitors depending on its concentration.

Clinical implications

As already discussed in a previous report from our team [16], the present study confirms that bone involvement is a late complication of cystinosis occurring in adolescents and young adults. Indeed, within our present cohort, transplant patients were significantly older than patients under conservative management, and they also presented significantly more bone

complications. It is of paramount importance to take these potential complications into account in the management of cystinosis patients, as they can considerably affect their quality of life and even require invasive procedures: indeed, in our cohort, 38% of patients with bone involvement had to undergo orthopedic surgery.

Contextual setting

Our work echoes the study carried out by *Conforti et al.* [19] on the osteoblastic differentiation abilities of mesenchymal stem cells (MSCs) isolated from a cystinotic patient, in which authors demonstrated that cystinotic MSCs display a reduced ability to differentiate into osteoblasts, which can be reverted after cysteamine treatment. However, the current study focuses on osteoclasts in order to explain the altered bone phenotype of cystinotic patients. It extends the results of our previous work on cystinosis-induced osteoclastic dysfunction, in which we showed that CTNS is required for proper osteoclastic activity (with an expression peak on day 6 of the differentiation process, following the same pattern as cathepsin K transcripts), and that *in vitro* cysteamine has antiresorptive effects on controls as well as patients-derived osteoclasts [21]. While in our previous work, no significant effect of cysteamine on osteoclastic differentiation could be demonstrated, the current study has made it possible to highlight a decreased propensity of patients-derived mononuclear progenitors to generate osteoclasts, thanks to the recruitment of a larger number of patients.

Osteoclasts RNA expression profile

We chose to investigate the expression of two osteoclastic markers: DC-STAMP, an early differentiation marker and CTSK, a later marker [35]. At baseline, the expression of both markers is increased in patients compared to controls. These observations might account for the increased propensity of patients-derived progenitors to differentiate into osteoclasts and explain, at least in part, the resorptive bone phenotype observed in cystinotic patients, cathepsin K being one of the main proteases involved in bone turnover and resorption. The RNA

expression profile of patients-derived osteoclasts versus control osteoclasts differed in our two studies. While we previously showed a decreased expression of CTSK in patients compared to controls at baseline [21], the current study demonstrates the opposite. This discrepancy could be explained by the different populations in these two studies: indeed, most patients in the previous study were transplant recipients and dialysis patients whilst most patients in the current study were under conservative kidney management (CKM). Moreover, the patients from the current study were also significantly younger than in the previous paper (median age at inclusion of 23 (10-35) *versus* 14 (7-17) years, respectively). Older age and end-stage renal disease are in themselves factors that affect osteoclastic function [36, 37], which may explain the differences in RNA expression profile observed between the two populations. It should also be noted that we had fewer control subjects in the current study, which warrants caution in interpreting results.

The decreased expression of CTSK in patients at a low cysteamine concentration (50 μ M) resonates with our previous observations regarding the antiresorptive effect of cysteamine, a potentially beneficial effect which appears lost at a higher cysteamine concentration [21]. The increased DC-STAMP expression at the same cysteamine concentration (50 μ M) does not appear to be correlated with an increased number of osteoclasts in cultures, based on the current results. On the other hand, the decrease in its expression at 200 μ M of cysteamine correlates with the decrease in the final osteoclast number. The results concerning DC-STAMP are to be interpreted with caution: indeed, assessment of its expression level was carried out on day 7, *i.e.* at the end of the osteoclastic differentiation process. Since DC-STAMP is an early differentiation marker, it is reasonable to assume that an earlier assessment (day 3) would have been more relevant in order to highlight different expression levels, depending on the genotype of monocyte progenitors and their response to various concentrations of cysteamine. We were

however unable to carry out this intermediate analysis because of the limited number of cells obtained directly from patients.

Galectin-3 in cystinosis

Cystinosis was recently found to enhance lysosomal localization and degradation of galectin-3 [22]. In *Ctns*^{-/-} mice, galectin-3 is overexpressed in the kidney. Notably, the absence of galectin-3 in *Ctns*^{-/-} *Gal-3*^{-/-} double knockout mice improves pathologic renal function/structure and decreases macrophage/monocyte infiltration in the kidney compared to *Ctns*^{-/-} mice, strongly suggesting that galectin-3 mediates inflammation involved in the progression of kidney disease in cystinosis. Interestingly, our results show that galectin-3 is also overexpressed in patients' osteoclasts at baseline compared to controls and that this overexpression is further increased by cysteamine in a dose-dependent manner. These observations constitute a rationale for a mechanistic study of galectin-3, its role in the pathogenesis of bone involvement in cystinosis and its interaction with cysteamine. In this regard, it has already been shown in a mouse model that invalidation of *Lgals3* leads to an alteration of the terminal differentiation of bone cells, a reduction in the mineralization capacities of osteoblasts and a reduction in the resorption activity of osteoclasts. Phenotype observation of disabled mice shows attenuated bone formation, increased bone resorption, acceleration of age-related trabecular loss and impaired bone strength [23]. This increased resorption, despite reduced osteoclastic activity, could be explained by bone inflammation (increased expression of inflammatory cytokines *Il6* and *Il1β* in *Lgals3*^{-/-} mice), potentially responsible for a disruption of osteoblasts/osteoclasts coordination signals.

It appears through this mouse knockout model that galectin-3 plays a role in bone homeostasis and in the dialogue between osteoblasts and osteoclasts. Indeed, *in vitro*, galectin-3 is secreted by osteoblasts and inhibits osteoclastogenesis, thus participating in the maintenance of trabecular homeostasis independently of the RANKL / OPG axis [24]. It is therefore plausible

to hypothesize that cystinosis-related overexpression of galectin-3 in bone cells participates in bone phenotype impairment.

Genotype-phenotype association

The genotype / phenotype analysis that we propose hinges on the first rational classification of mutations in the *CTNS* gene (**Figure 5**), based on the functional consequences of these mutations on the structure of cystinosin. In the light of our latest results, this classification appears relevant since it makes it possible to predict a response profile to cysteamine as a function of the patient's genotype. These findings may be of great clinical interest for the management of cysteamine therapy, which should reconcile - especially in patients most at risk of toxicity - effectiveness in reducing lysosomal cystine concentrations and preservation of bone capital.

Proposed hypothesis

Without cysteamine, the number of osteoclasts was higher in cultures from subjects in whom cystinosin was inactive or absent, as compared to subjects in whom cystinosin retained residual activity. Mechanistically, this observation may be explained by the role that the mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) and its interaction with the Regulator-Rag complex play during osteoclastogenesis. It has been established that mTORC1 activity is down-regulated during osteoclastic differentiation through the negative regulator TSC1, whose absence impairs RANKL-dependent osteoclastogenesis. Furthermore, *Andrzejewska et al.* have shown that the mTORC1 pathway is downregulated in proximal tubular cell lines derived from *Ctns*^{-/-} mice [38]. A similar down-regulation in human osteoclastic progenitors might account for the overall increased osteoclastogenesis that we observe in cystinosis patients, as compared to controls. *Andrzejewska et al.* also demonstrated that cystinosin is a component of the vacuolar H⁺-ATPase-Regulator-Rag complex which controls mTORC1 localization to lysosomes and thus, mTORC1 signaling [38] (**Figure 6**).

DNA mutations in the *CTNS* gene have various functional consequences, linked to their structural impact on cystinosin. Extensive deletions (such as the 57-kb deletion) cause the absence of protein while severe truncating mutations lead to the synthesis of an inactive variant. Both these situations amount to a loss of cystinosin efflux function. In contrast, milder mutations allow the synthesized cystinosin variant to retain residual activity. It is interesting to hypothesize that, as well as they cancel cystinosin efflux function, severe *CTNS* mutations impair the interaction between the Ragulator-Rag complex (of which cystinosin is a component) and mTORC1, preventing its activation. On the other hand, mutations of more limited structural impact might allow, in some extent, to maintain an efflux activity as well as the interaction between mTORC1 and the lysosomal membrane-attached Ragulator-Rag complex. This hypothesis would explain the correlation we observed at baseline between the severity of the mutation, its impact on cystinosin efflux function and the outcome in terms of osteoclastogenesis (increased osteoclast number in the AP and IP groups, compared to the RA group). It could be argued that the downregulation of mTORC1 is due to the accumulation of cystine, which would logically be greater in the AP and IP groups. However, as shown in the *Andrzejewska et al.* study, decrease of lysosomal cystine levels by cysteamine did not rescue mTORC1 activation in proximal tubular cells, thus suggesting that the downregulation of mTORC1 is due to the absence of cystinosin rather than to the accumulation of cystine [38]. Following this logic, the difference in response profile to cysteamine between the AP / IP groups and the RA group might not be linked to mTORC1 but to other signaling pathways, the nature of which remains to be determined.

Limitations and strengths

The main strength of this study is the protocol implemented to obtain cultures of human bone cells. It is an innovative, minimally invasive but hugely time-consuming technique that allows a direct access, from a small blood sample, to the patient's osteoclasts. The main limitation is

represented by the relative limited number of patients included, a frequent problem in the study of orphan diseases.

CONCLUSION

Bone involvement is a late complication of cystinosis, whose recent description is linked to the considerable improvement in patients' survival under cysteamine therapy. In regards to its clinical importance, recent international guidelines on evaluation and management of cystinosis bone disease have been published [17]. In addition to its beneficial effects in terms of renal survival and overall morbidity and mortality, cysteamine has a direct effect on bone metabolism which depends on the concentration at which it is administered. Observing the link between genotype and osteoclastic response to cysteamine in humans constitutes a first step towards the implementation of personalized medicine in cystinosis, according to the genetic background of each patient. The objective is ultimately to offer each patient the most suitable therapy in terms of efficiency and preservation of bone capital. Given the systemic nature of cystinosis, it is legitimate to ask whether these results can be generalized to all affected organs and tissues. Considering the major impact of cystinosis on endocrine functions, these observations especially raise questions about the response of endocrine cells to cysteamine depending on its concentration.

REFERENCES

1. Town, M., Jean, G., Cherqui, S., Attard, M., Forestier, L., Whitmore, S.A., Callen, D.F., Gribouval, O., Broyer, M., Bates, G.P., van't Hoff, W., Antignac, C., 1998. A novel gene encoding an integral membrane protein is mutated in nephropathic cystinosis. *Nat. Genet.* 18, 319–324. <https://doi.org/10.1038/ng0498-319>
2. Elmonem, M.A., Veys, K.R., Soliman, N.A., van Dyck, M., van den Heuvel, L.P., Levtschenko, E., 2016. Cystinosis: a review. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 11, 47. <https://doi.org/10.1186/s13023-016-0426-y>
3. David, D., Princiero Berlingiero, S., Elmonem, M.A., Oliveira Arcolino, F., Soliman, N., van den Heuvel, B., Gijsbers, R., Levtschenko, E., 2019. Molecular Basis of Cystinosis: Geographic Distribution, Functional Consequences of Mutations in the CTNS Gene, and Potential for Repair. *Nephron* 141, 133–146. <https://doi.org/10.1159/000495270>
4. Cherqui, S., Courtoy, P.J., 2017. The renal Fanconi syndrome in cystinosis: pathogenic insights and therapeutic perspectives. *Nat Rev Nephrol* 13, 115–131. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2016.182>
5. Nesterova G, Gahl WA. Cystinosis. 2001 Mar 22 [Updated 2017 Dec 7]. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., editors. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2019. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1400/>
6. Markello, T.C., Bernardini, I.M., Gahl, W.A., 1993. Improved renal function in children with cystinosis treated with cysteamine. *N. Engl. J. Med.* 328, 1157–1162. <https://doi.org/10.1056/NEJM199304223281604>
7. Gahl, W.A., Thoene, J.G., Schneider, J.A., 2002. Cystinosis. *N. Engl. J. Med.* 347, 111–121. <https://doi.org/10.1056/NEJMra020552>
8. Gahl, W.A., Reed, G.F., Thoene, J.G., Schulman, J.D., Rizzo, W.B., Jonas, A.J., Denman, D.W., Schlesselman, J.J., Corden, B.J., Schneider, J.A., 1987. Cysteamine Therapy for Children with Nephropathic Cystinosis. *New England Journal of Medicine* 316, 971–977. <https://doi.org/10.1056/NEJM198704163161602>
9. Kleta, R., Gahl, W.A., 2004. Pharmacological treatment of nephropathic cystinosis with cysteamine. *Expert Opin Pharmacother* 5, 2255–2262. <https://doi.org/10.1517/14656566.5.11.2255>
10. Brodin-Sartorius, A., Tête, M.-J., Niaudet, P., Antignac, C., Guest, G., Ottolenghi, C., Charbit, M., Moyse, D., Legendre, C., Lesavre, P., Cochat, P., Servais, A., 2012. Cysteamine therapy delays the progression of nephropathic cystinosis in late adolescents and adults. *Kidney Int.* 81, 179–189. <https://doi.org/10.1038/ki.2011.277>
11. Nesterova, G., Williams, C., Bernardini, I., Gahl, W.A., 2015. Cystinosis: renal glomerular and renal tubular function in relation to compliance with cystine-depleting therapy. *Pediatr. Nephrol.* 30, 945–951. <https://doi.org/10.1007/s00467-014-3018-x>

12. Gahl, W.A., Balog, J.Z., Kleta, R., 2007. Nephropathic cystinosis in adults: natural history and effects of oral cysteamine therapy. *Ann. Intern. Med.* 147, 242–250.
<https://doi.org/10.7326/0003-4819-147-4-200708210-00006>
13. Zimakas, P.J.A., Sharma, A.K., Rodd, C.J., 2003. Osteopenia and fractures in cystinotic children post renal transplantation. *Pediatr. Nephrol.* 18, 384–390.
<https://doi.org/10.1007/s00467-003-1093-5>
14. Besouw MTP, Bowker R, Dutertre J-P, Emma F, Gahl WA, Greco M, et al. Cysteamine toxicity in patients with cystinosis. *J Pediatr.* déc 2011;159(6):1004-11.
<https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2011.05.057>
15. Bacchetta J, Greco M, Bertholet-Thomas A, Nobili F, Zustin J, Cochat P, et al. Skeletal implications and management of cystinosis: three case reports and literature review. *Bonekey Rep* [Internet]. 17 août 2016 [cité 25 mai 2019];5.
<https://dx.doi.org/10.1038%2Fbonekey.2016.55>
16. Bertholet-Thomas A, Claramunt-Taberner D, Gaillard S, Deschênes G, Sornay-Rendu E, Szulc P, et al. Teenagers and young adults with nephropathic cystinosis display significant bone disease and cortical impairment. *Pediatr Nephrol.* 2018;33(7):1165-72.
<https://doi.org/10.1007/s00467-018-3902-x>
17. Hohenfellner, K., Rauch, F., Ariceta, G., Awan, A., Bacchetta, J., Bergmann, C., Bechtold, S., Cassidy, N., Deschenes, G., Elenberg, E., Gahl, W.A., Greil, O., Harms, E., Herzig, N., Hoppe, B., Koeppl, C., Lewis, M.A., Levchenko, E., Nesterova, G., Santos, F., Schlingmann, K.P., Servais, A., Soliman, N.A., Steidle, G., Sweeney, C., Treikauskas, U., Topaloglu, R., Tsygin, A., Veys, K., Vigier, R., Zustin, J., Haffner, D., 2019. Management of bone disease in cystinosis: Statement from an international conference. *Jrnl of Inher Metab Disea* 42, 1019–1029. <https://doi.org/10.1002/jimd.12134>
18. Cherqui, S., Sevin, C., Hamard, G., Kalatzis, V., Sich, M., Pequignot, M.O., Gogat, K., Abitbol, M., Broyer, M., Gubler, M.-C., Antignac, C., 2002. Intralysosomal cystine accumulation in mice lacking cystinosin, the protein defective in cystinosis. *Mol. Cell. Biol.* 22, 7622–7632.
<https://doi.org/10.1128/mcb.22.21.7622-7632.2002>
19. Conforti A, Taranta A, Biagini S, Starc N, Pitisci A, Bellomo F, et al. Cysteamine treatment restores the in vitro ability to differentiate along the osteoblastic lineage of mesenchymal stromal cells isolated from bone marrow of a cystinotic patient. *J Transl Med* [Internet]. 7 mai 2015 [cité 25 mai 2019];13. <https://dx.doi.org/10.1186%2Fs12967-015-0494-0>
20. Battafarano, G., Rossi, M., Rega, L.R., Di Giovamberardino, G., Pastore, A., D'Agostini, M., Porzio, O., Nevo, N., Emma, F., Taranta, A., Del Fattore, A., 2019. Intrinsic Bone Defects in Cystinotic Mice. *Am. J. Pathol.* 189, 1053–1064.
<https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2019.01.015>

21. Claramunt-Taberner, D., Flammier, S., Gaillard, S., Cochat, P., Peyruchaud, O., Machuca-Gayet, I., Bacchetta, J., 2018. Bone disease in nephropathic cystinosis is related to cystinosis-induced osteoclastic dysfunction. *Nephrol. Dial. Transplant.* 33, 1525–1532. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfx362>
22. Lobry, T., Miller, R., Nevo, N., Rocca, C.J., Zhang, J., Catz, S.D., Moore, F., Thomas, L., Pouly, D., Bailleux, A., Guerrero, I.C., Gubler, M.-C., Cheung, W.W., Mak, R.H., Montier, T., Antignac, C., Cherqui, S., 2019. Interaction between galectin-3 and cystinosis uncovers a pathogenic role of inflammation in kidney involvement of cystinosis. *Kidney Int.* <https://doi.org/10.1016/j.kint.2019.01.029>
23. Iacobini, C., Blasetti Fantauzzi, C., Bedini, R., Pecci, R., Bartolazzi, A., Amadio, B., Pesce, C., Pugliese, G., Menini, S., 2018. Galectin-3 is essential for proper bone cell differentiation and activity, bone remodeling and biomechanical competence in mice. *Metab. Clin. Exp.* 83, 149–158. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2018.02.001>
24. Simon, D., Derer, A., Andes, F.T., Lezuo, P., Bozec, A., Schett, G., Herrmann, M., Harre, U., 2017. Galectin-3 as a novel regulator of osteoblast-osteoclast interaction and bone homeostasis. *Bone* 105, 35–41. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2017.08.013>
25. Ivanova, E.A., van den Heuvel, L.P., Elmonem, M.A., De Smedt, H., Missiaen, L., Pastore, A., Mekahli, D., Bultynck, G., Levchenko, E.N., 2016. Altered mTOR signalling in nephropathic cystinosis. *J. Inherit. Metab. Dis.* 39, 457–464. <https://doi.org/10.1007/s10545-016-9919-z>
26. Fitter, S., Matthews, M.P., Martin, S.K., Xie, J., Ooi, S.S., Walkley, C.R., Codrington, J.D., Ruegg, M.A., Hall, M.N., Proud, C.G., Gronthos, S., Zannettino, A.C.W., 2017. mTORC1 Plays an Important Role in Skeletal Development by Controlling Preosteoblast Differentiation. *Mol. Cell. Biol.* 37. <https://doi.org/10.1128/MCB.00668-16>
27. Chen, J., Long, F., 2018. mTOR signaling in skeletal development and disease. *Bone Research* 6, 1. <https://doi.org/10.1038/s41413-017-0004-5>
28. Hiraiwa M, Ozaki K, Yamada T, et al. mTORC1 Activation in Osteoclasts Prevents Bone Loss in a Mouse Model of Osteoporosis. *Front Pharmacol.* 2019;10:684. Published 2019 Jun 13. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00684>
29. Huynh, H., Wan, Y. mTORC1 impedes osteoclast differentiation via calcineurin and NFATc1. *Commun Biol* 1, 29 (2018) <https://doi.org/10.1038/s42003-018-0028-4>
30. Kalatzis, V., Cohen-Solal, L., Cordier, B., Frishberg, Y., Kemper, M., Nuutinen, E.M., Legrand, E., Cochat, P., Antignac, C., 2002. Identification of 14 novel CTNS mutations and characterization of seven splice site mutations associated with cystinosis. *Hum. Mutat.* 20, 439–446. <https://doi.org/10.1002/humu.10141>
31. Kiehntopf, M., Schickel, J., Gönne, B. von der, Koch, H.G., Superti-Furga, A., Steinmann, B., Deufel, T., Harms, E., 2002. Analysis of the CTNS gene in patients of German and Swiss origin with nephropathic cystinosis. *Hum. Mutat.* 20, 237. <https://doi.org/10.1002/humu.9063>

32. Shotelersuk, V., Larson, D., Anikster, Y., McDowell, G., Lemons, R., Bernardini, I., Guo, J., Thoene, J., Gahl, W.A., 1998. CTNS mutations in an American-based population of cystinosis patients. *Am. J. Hum. Genet.* 63, 1352–1362. <https://doi.org/10.1086/302118>
33. Soliman, N.A., Elmonem, M.A., van den Heuvel, L., Abdel Hamid, R.H., Gamal, M., Bongaers, I., Marie, S., Levchenko, E., 2014. Mutational Spectrum of the CTNS Gene in Egyptian Patients with Nephropathic Cystinosis. *JIMD Rep* 14, 87–97. https://doi.org/10.1007/8904_2013_288
34. Kalatzis, V., Nevo, N., Cherqui, S., Gasnier, B., Antignac, C., 2004. Molecular pathogenesis of cystinosis: effect of CTNS mutations on the transport activity and subcellular localization of cystinosin. *Hum Mol Genet* 13, 1361–1371. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddh152>
35. Asagiri, M., Takayanagi, H., 2007. The molecular understanding of osteoclast differentiation. *Bone* 40, 251–264. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2006.09.023>
36. Chung, P.-L., Zhou, S., Eslami, B., Shen, L., LeBoff, M.S. and Glowacki, J. (2014), Effect of Age on Regulation of Human Osteoclast Differentiation. *J. Cell. Biochem.*, 115: 1412-1419. <https://doi.org/10.1002/jcb.24792>
37. Elder, G.J. Pathophysiology of CKD-MBD. *Clinic Rev Bone Miner Metab* **10**, 128–141 (2012). <https://doi.org/10.1007/s12018-011-9120-8>
38. Andrzejewska, Z., Nevo, N., Thomas, L., Chhuon, C., Bailleux, A., Chauvet, V., Courtoy, P.J., Chol, M., Guerrero, I.C., Antignac, C., 2016. Cystinosin is a Component of the Vacuolar H⁺-ATPase-Ragulator-Rag Complex Controlling Mammalian Target of Rapamycin Complex 1 Signaling. *J. Am. Soc. Nephrol.* 27, 1678. <https://doi.org/10.1681/ASN.2014090937>
39. Marlous J. Groenewoud, Fried J.T. Zwartkruis; Rheb and Rags come together at the lysosome to activate mTORC1. *Biochem Soc Trans* 1 August 2013; 41 (4): 951–955. <https://doi.org/10.1042/BST20130037>

Table 1. Baseline characteristics of the patients

PN	Renal status	Age (years)	Gender	DNA mutation	Protein mutation	Outcome	Affected exons	GFR	Cysteamine daily dose (mg/m ²)	LHL (μmol/g of proteins)	rhGH	Past of fracture	BD	BP	Any bone symptoms
1	C	4	M	c.922G>A / c.922G>A	p.G308R / p.G308R	RA	11 / 11	34	560	0.7	No	No	No	No	No
2	T	30	F	c.1015G>A / del 57 kb	p.G339R / p.?	RA	12 / 1 to 10	62	1630	2.1	No	No	Yes	No	Yes
3	C	15	F	c.829dupA / c.829dupA	p.T277Nfs*19 / p.T277Nfs*19	IP	10 / 10	38	1620	1.9	Yes	No	Yes	Yes	Yes
4	C	5	F	del 57 kb / del 57 kb	p.? / p.?	AP	1 to 10 / 1 to 10	71	950	1	No	No	No	No	No
5	C	7	F	del 57 kb / c.1-?_61+?del	p.? / p.?	RA	1 to 10 / 3	79	580	0.2	No	No	No	No	No
6	T	17	M	c.314_317del / c.314_317del	p.H105Pfs*12 / p.H105Pfs*12	IP	6 / 6	112	990	0.7	No	Yes	Yes	Yes	Yes
7	C	16	M	del 57 kb / del 57 kb	p.? / p.?	AP	1 to 10 / 1 to 10	23	1240	3.7	Yes	No	Yes	Yes	Yes
8	C	3	F	del 57 kb / c.873C>G	p.? / p.Tyr291*	IP	1 to 10 / 11	149	2500	1.8	No	No	No	No	No
9	C	2	F	del 57 kb / c.873C>G	p.? / p.Tyr291*	IP	1 to 10 / 11	105	3610	2.2	No	No	No	No	No
10	T	18	F	del 57 kb / c.62-?_225+?del	p.? / p.?	AP	1 to 10 / 4 and 5	105	1460	0.2	No	No	No	No	No
11	C	14	F	del 57 kb / c.62-?_225+?del	p.? / p.?	AP	1 to 10 / 4 and 5	64	1760	1.1	Yes	No	No	No	No
12	C	9	M	del 57 kb / del 57 kb	p.? / p.?	AP	1 to 10 / 1 to 10	84	1420	0.8	Yes	No	No	No	No
13	C	8	M	c.198_218del / c.559_561+24del	p.Ile67_Pro73del / splicing	RA	5 / 8	62	1110	1.4	Yes	No	Yes	No	Yes
14	C	15	M	del 57 kb / del 57 kb	p.? / p.?	AP	1 to 10 / 1 to 10	127	1230	1	Yes	No	No	No	No
15	T	61	F	del 57 kb / c.923G>T	p.? / p.G308V	RA	1 to 10 / 11	50	0	0.7	No	Yes	No	No	Yes
16	T	18	M					59	1039	3.3	No	No	Yes	Yes	Yes
17	C	14	M					28	238	1.2	No	No	Yes	No	Yes

PN, patient number; GFR, glomerular filtration rate (ml/min/1.73m²); rhGH, recombinant human growth hormone; LHL, leukocyte hemicystin levels;

BD, bone deformation; BP, bone pain

C, conservative kidney management; T, kidney transplant; M, male; F, female; RA, residual activity; IP, inactive protein; AP, absent protein

Protein mutation “p.”, protein variant of undetermined structure

Fields were hatched when data was not available.

Table 2. Patients characteristics according to renal management modality

Cystinosis patients	Conservative management	Renal transplantation
Number of patients	12	5
Age (y/o)	9 (5 ; 14)*	18 (18 ; 30)
Hemicystin (μmol/g prot)	1.2 (1.0 ; 1.8)	0.7 (0.7 ; 2.1)
Cysteamine daily dose (mg/m²)	1330 (1070 ; 1915)	1039 (990 ; 1460)
GFR (ml/min/1,73m²)	67 (37 ; 89)	68 (59 ; 105)
Calcium (mmol/l)	2.4 (2.3 ; 2.5)	2.4 (2.2 ; 2.4)
Phosphate (standard deviation for age)	-1.6 (-2.8 ; -1.2)	-1.4 (-1.7 ; -1.2)
PTH (ng/l)	21 (19 ; 42)	32 (21 ; 60)
25-D (ng/ml)	28 (23 ; 36)	26 (24 ; 26)
Total ALP (times the upper physiological value for gender and age)	0.9 (0.7 ; 1.1)	0.5 (0.4 ; 0.7)
Any bone symptoms	33%*	80%

Results are presented as median (Q1 ; Q3) and percentage.

**p < 0.05*

Table 3. Osteoclastic differentiation outcome in patients with cystinosis

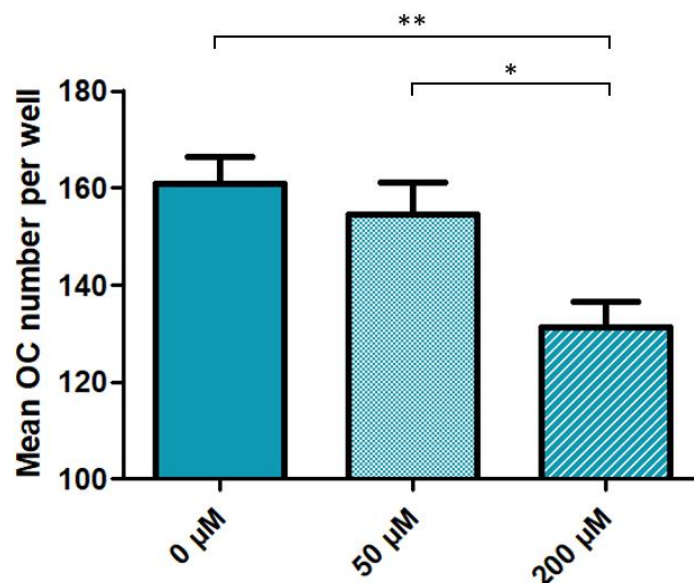
Patient number	Protein functionality	Cysteamine concentration		
		0 μ M	50 μ M	200 μ M
1	RA	203 $\pm$ 41	185 $\pm$ 44	147 $\pm$ 31
2	RA	105 $\pm$ 11	122 $\pm$ 13	67 $\pm$ 6
3	IP	44 $\pm$ 4	36 $\pm$ 5	29 $\pm$ 3
4	AP	111 $\pm$ 12	121 $\pm$ 19	97 $\pm$ 14
5	RA	65 $\pm$ 7	75 $\pm$ 6	52 $\pm$ 7
6	IP	181 $\pm$ 14	183 $\pm$ 23	147 $\pm$ 14
7	AP	94 $\pm$ 11	90 $\pm$ 6	100 $\pm$ 6
8	IP	171 $\pm$ 16	180 $\pm$ 13	160 $\pm$ 13
9	IP	187 $\pm$ 19	206 $\pm$ 22	205 $\pm$ 25
10	AP	168 $\pm$ 14	173 $\pm$ 17	127 $\pm$ 5
11	AP	48 $\pm$ 3	48 $\pm$ 4	42 $\pm$ 5
12	AP	148 $\pm$ 9	115 $\pm$ 9	87 $\pm$ 6
13	RA	117 $\pm$ 7	125 $\pm$ 12	107 $\pm$ 9
14	AP	44 $\pm$ 5	48 $\pm$ 4	39 $\pm$ 3
15	RA	197 $\pm$ 9	210 $\pm$ 20	178 $\pm$ 8
16		162 $\pm$ 16	129 $\pm$ 17	114 $\pm$ 14
17		172 $\pm$ 20	121 $\pm$ 14	105 $\pm$ 10

Multinucleated TRAP-positive cells (over 3 nuclei) were generated from PBMCs with increasing doses of cysteamine (untreated, 50 and 200 μ M) and counted.

RA, Residual Activity; IP, Inactive Protein; AP, Absent Protein

The results are presented as means for 7 to 8 wells $\pm$ SEM (standard error of the mean).

Fig. 1 Impact of cysteamine treatment on osteoclast differentiation in patients with cystinosis



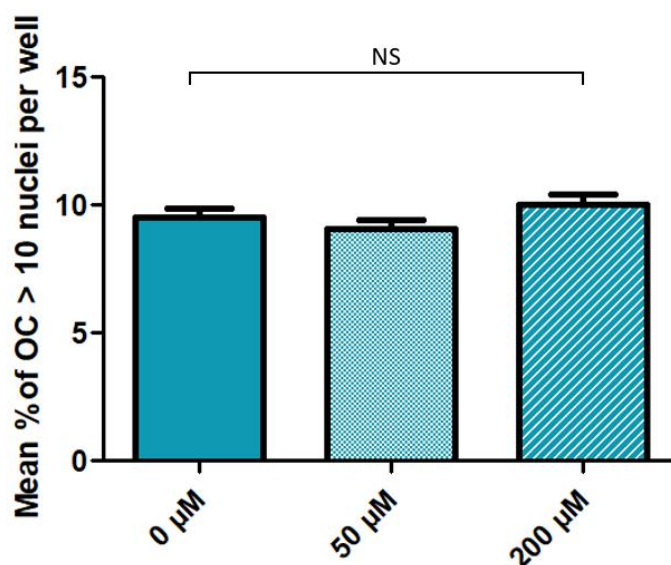
Osteoclasts (TRAP-positive cells with over 3 nuclei) were generated from PBMCs of cystinotic patients, and treated with increasing doses of cysteamine (untreated, 50 and 200 μM).

Results in terms of osteoclasts number are presented as means for 7 to 8 wells, with SEM. A total of 13 patients were included in the analysis, as results of cell cultures were not satisfactory for the remaining 5 patients.

OC, osteoclasts; TRAP, Tartrate-Resistant Acid Phosphatase; PBMC, Peripheral Blood Mononuclear Cells; SEM, Standard Error of the Mean

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ compared between indicated groups

Fig. 2 Impact of cysteamine treatment on osteoclast multinucleation in patients with cystinosis



Osteoclasts (TRAP-positive cells with over 3 nuclei) were generated from PBMCs of cystinotic patients, and treated with increasing doses of cysteamine (untreated, 50 and 200 μM).

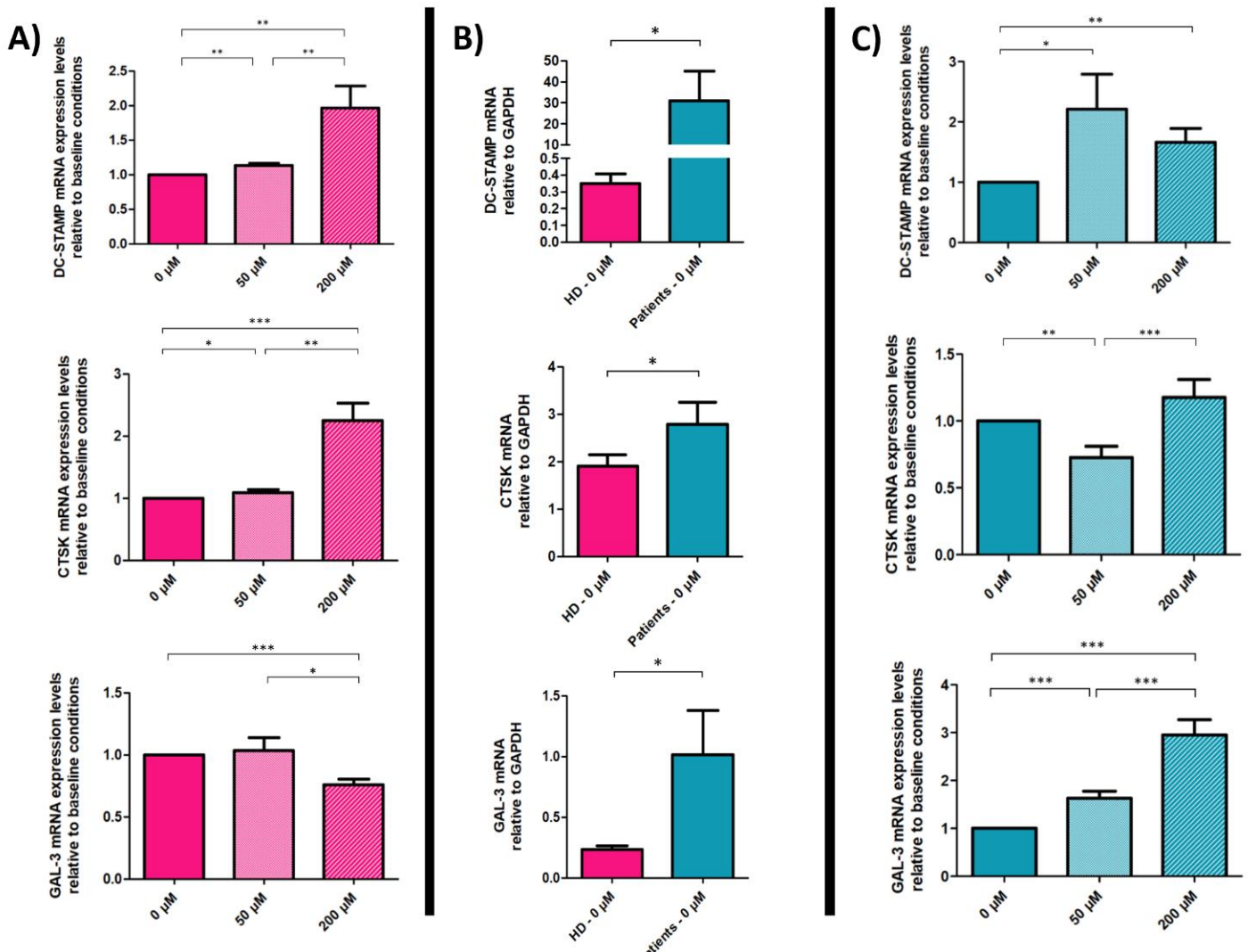
Results in terms of high nuclei number osteoclasts are presented as mean percentage for 7 to 8 wells, with SEM.

A total of 13 patients were included in the analysis, as results of cell cultures were not satisfactory for the remaining 5 patients.

OC, osteoclasts; TRAP, Tartrate-Resistant Acid Phosphatase; PBMC, Peripheral Blood Mononuclear Cells; SEM, Standard Error of the Mean

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ compared between indicated groups

Fig. 3 Effects of genotype and cysteamine treatment on osteoclast RNA expression profile



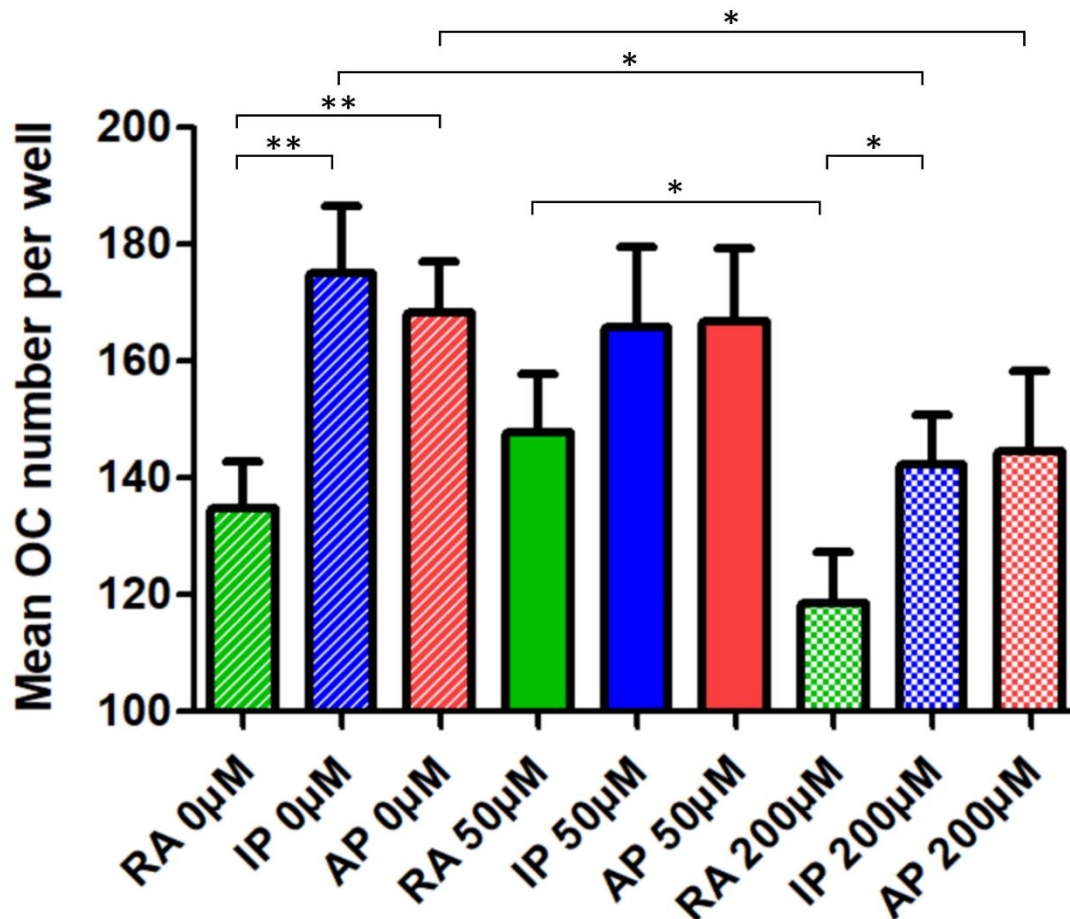
To assess the ability of human PBMCs from cystinosis patients (N=9) and healthy donors (N=3) to differentiate into osteoclasts in the presence of cysteamine, we determined the expression level of early and late osteoclast specific markers by real-time PCR, including DC-STAMP (Dendritic Cell-Specific Transmembrane Protein) and CTSK (Cathepsin K), at day 7 after induction of osteoclastic differentiation. We then determined the expression of GAL-3 (Galectin-3), a protein involved in bone homeostasis which accumulates in the cells of cystinosis patients due to defective lysosomal degradation.

Expression of these genes was quantified and normalized to corresponding GAPDH values. We compared the expression level of these genes in healthy donors and patients at baseline (**column B**). Expression levels of DC-STAMP, CTSK and GAL-3 at 50 and 200 μ M of cysteamine are presented relative to their own expression level at baseline for healthy donors (**column A**) and cystinosis patients (**column C**).

Baseline = 0 μ M of cysteamine

*P < 0.05, ** P < 0.01 and ***P < 0.001 compared between indicated groups

Fig. 4 Impact of genotype and cysteamine treatment on osteoclast differentiation in patients with cystinosis



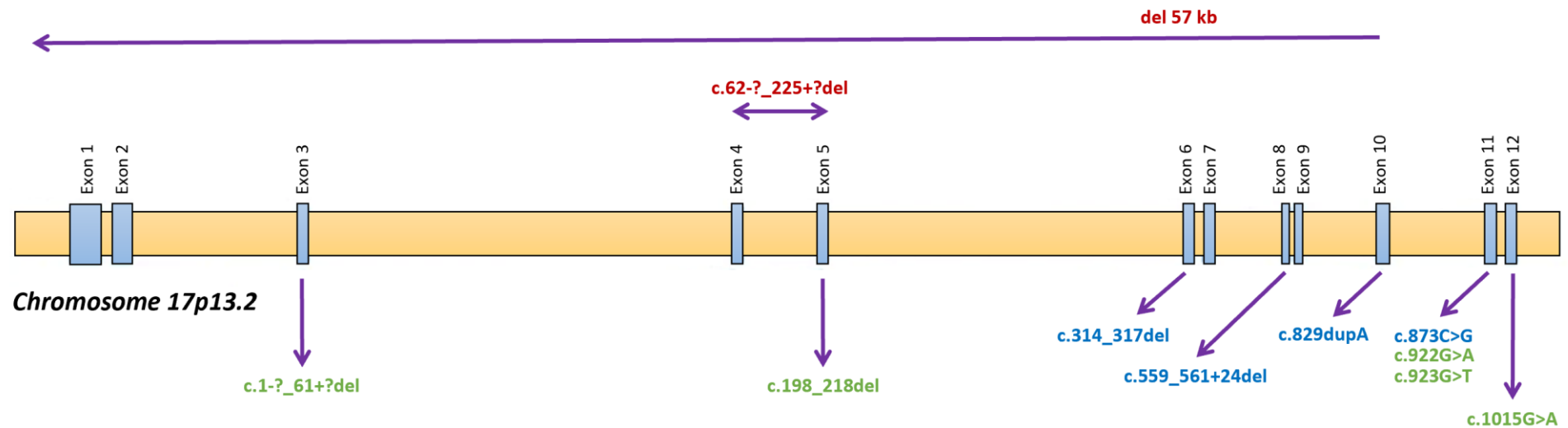
Osteoclasts (TRAP-positive cells with over 3 nuclei) were generated from PBMCs of cystinotic patients, and treated with increasing doses of cysteamine (untreated, 50 and 200 μ M).

Results in terms of osteoclasts number are presented as means for 7 to 8 wells, with SEM. A total of 11 patients were included in the analysis, as data on genotype was not available for 2 of the 13 patients whose cultures developed properly.

RA, residual activity; IP, inactive protein; AP, absent protein; OC, osteoclasts; TRAP, Tartrate-Resistant Acid Phosphatase; PBMC, Peripheral Blood Mononuclear Cells; SEM, Standard Error of the Mean

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ compared between indicated groups

Fig. 5 Topography of mutations in the CTNS gene



Schematic illustration of the CTNS gene with display of the mutations' genomic location within our cohort.

Exonic mutations are displayed in the bottom area of the figure.

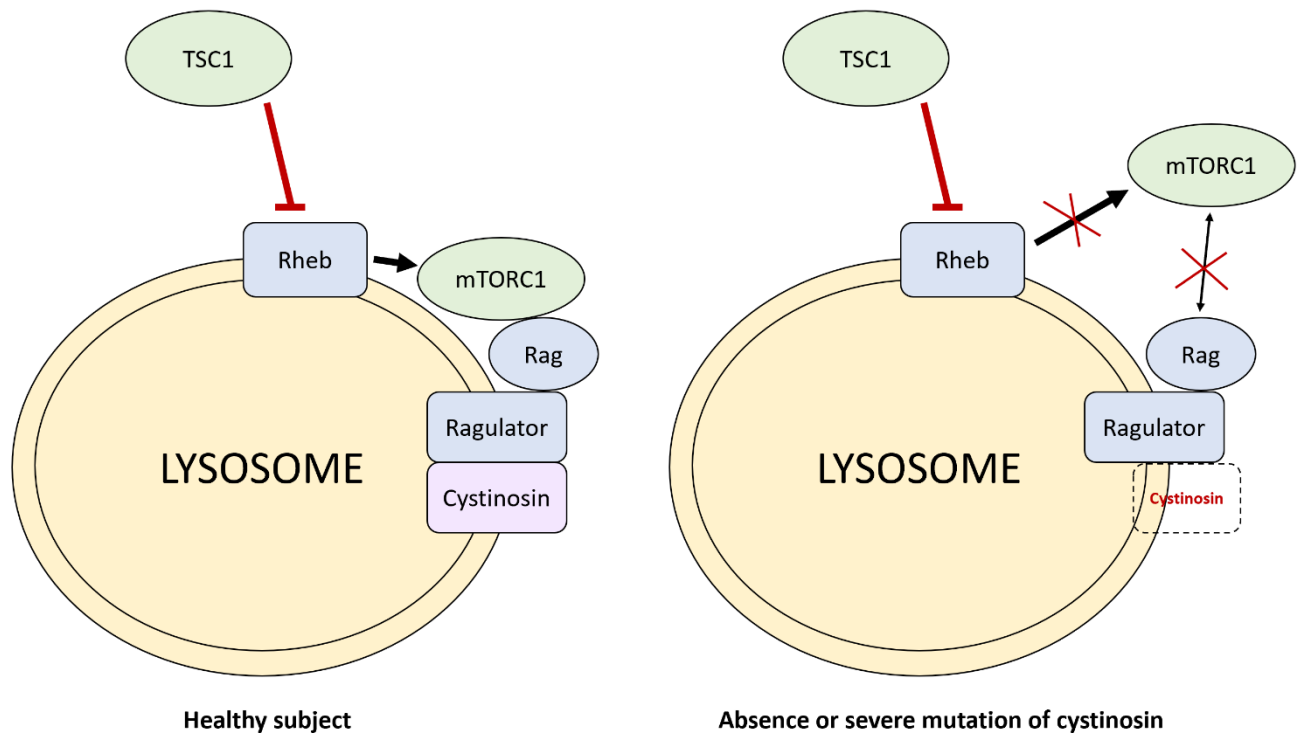
Large deletions are displayed in the top area.

Green : residual activity (RA)

Blue : inactive protein (IP)

Red : absent protein (AP)

Fig. 6 Regulation of mTORC1 activation



The Ragulator-Rag Complex has a key role in mTOR signaling regulation. The Ragulator, along with the Rag GTPases, are necessary for the localization of mTORC1 to the lysosome surface. When enough amino acids are present, Rag GTPases become activated, which leads to the translocation of mTORC1 from the cytoplasm to the lysosome surface. This process allows mTORC1 to bind to Rheb, which induces the kinase activity of mTORC1 [39]. Absence or severe mutation of cystinosis, a component of the Ragulator-Rag complex, might prevent the activation of mTORC1 by Rheb.

TSC1, Tuberous Sclerosis Complex 1; mTORC1, mammalian target of rapamycin complex 1

VU

NANCY, le **1er mars 2020**

Le Président de Thèse

NANCY, le **04 mars 2020**

Le Doyen de la Faculté de Médecine

Professeur Cyril SCHWEITZER

Professeur Marc BRAUN

AUTORISE À SOUTENIR ET À IMPRIMER LA THÈSE/ **11094**

NANCY, le **05 mars 2020**

LE PRÉSIDENT DE L'UNIVERSITÉ DE LORRAINE,

Professeur Pierre MUTZENHARDT

RESUME DE LA THESE

Introduction La cystinose est une maladie héréditaire du métabolisme provoquée par l'accumulation lysosomale de cystine. Bien que l'atteinte rénale de cette pathologie soit bien connue, ses complications osseuses n'ont été décrites que récemment. Les principaux objectifs de cette étude étaient de déterminer in vitro l'impact des mutations CTNS et de la cystéamine sur les ostéoclastes humains et de réaliser une analyse génotype-phénotype en termes de différenciation ostéoclastique et de réponse à la cystéamine.

Matériel et méthodes Les ostéoclastes humains ont été différenciés à partir des cellules mononuclées du sang périphérique (PBMCs) issues de patients de plusieurs centres européens. Ces cellules ont été traitées avec des doses croissantes de cystéamine - 0 μ M (non traitées), 50 μ M, 200 μ M. Les résultats des cultures en termes de différenciation ostéoclastique et de profil d'expression ARN ont ensuite été évalués.

Résultats La cystéamine à forte dose (200 μ M) diminue la propension des progéniteurs monocytaires dérivés de patients à générer des ostéoclastes. Fait intéressant, les progéniteurs monocytaires de patients présentant une activité résiduelle de la cystinosine affichent une sensibilité particulière à la cystéamine, dont l'effet sur ces mêmes progéniteurs est biphasique en fonction de sa concentration (50 vs. 200 μ M). La cystéamine a également un impact significatif sur le profil d'expression de l'ARN des ostéoclastes de patients - profil déjà modifié par rapport aux sujets témoins. Cet impact varie également avec la concentration de cystéamine.

Conclusion L'effet de la cystéamine sur le métabolisme osseux dépend de plusieurs facteurs, dont la concentration à laquelle elle est administrée et le génotype des patients traités. La cystéamine à forte dose diminue la propension des progéniteurs monocytaires dérivés de patients à générer des ostéoclastes, quel que soit leur génotype. Cependant, l'étude de corrélation génotype / phénotype met en évidence un lien entre génotype et réponse ostéoclastique à diverses concentrations de cystéamine chez l'homme. Ces découvertes constituent une première étape vers la mise en place dans la cystinose d'une médecine personnalisée en fonction du patrimoine génétique de chaque patient.

TITRE EN ANGLAIS

Genotype/phenotype correlation in terms of osteoclastic response in patients with cystinosis.

THESE : MÉDECINE SPÉCIALISÉE - ANNÉE 2020

MOTS CLEFS : Cystinose, Cystéamine, Os, Ostéoclaste, Génotype

INTITULÉ ET ADRESSE :

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

Faculté de Médecine de Nancy

9, avenue de la Forêt de Haye

54505 VANDOEUVRE LES NANCY Cedex
