

## Thèse – Raquel RUIVO

**Résumé** : Les maladies de surcharge en acide sialique libre sont dues à des mutations du gène codant le transporteur lysosomal d'acides sialiques, la sialine. L'analyse fonctionnelle de quatre nouvelles mutations pathogènes a confirmé que la forme infantile de la maladie est due à une perte de fonction et suggère l'existence de facteurs environnementaux ou génétiques atténuateurs dans la relation génotype/phénotype. De plus, j'ai identifié 2 analogues synthétiques d'acides sialiques 10 à 20 fois plus affins que le substrat naturel. Ce résultat présente un intérêt potentiel pour le développement futur de thérapies pharmacologiques pour la forme adulte de ces maladies (maladie de Salla). La cystinosine est le transporteur lysosomal de cystine déficient dans les cystinoses. J'ai appliqué la technique de voltage imposé à 2 électrodes à la cystinosine humaine pour caractériser son activité et montré que la cystinosine co-transporte sélectivement des molécules de cystine et des protons avec une stœchiométrie 1:1. D'autre part, une étude plus poussée a révélé que la liaison de cystine est couplée à la protonation du résidu D305 situé à proximité du compartiment cytosolique, mais accessible depuis le compartiment lysosomal. En raison de sa position, ce résidu pourrait participer au transport de proton en le libérant ensuite dans le cytosol.

**Abstract** : Free sialic acid storage diseases (SSD) are caused by mutations of a lysosomal sialic acid transporter named sialin. Functional analysis of novel pathogenic mutations confirmed that infantile SSD is caused by loss of function and suggested that genetic or environmental factors alter the genotype/phenotype relationship. Moreover, we identified synthetic analogues with up to 20 fold higher affinity for sialin than natural sialic acids, thus providing a first step towards pharmacological chaperone therapy of adult SSD. Cystinosin is a lysosomal cystine transporter defective in cystinosis. Two electrode voltage clamp analysis of human cystinosin showed that it mediates a selective 1:1 H<sup>+</sup>/cystine symport and that cystine binding is coupled to protonation from the lysosomal compartment of a residue, D305, electrically close to the cytosol. We thus propose that D305 protonation represents a first step in the symport mechanism and that D305 eventually releases its H<sup>+</sup> into the cytosol.