# UNIVERSITE PARIS-SACLAY



« Mécanismes moléculaires et cellulaires des paraplégies spastiques héréditaires liées aux mutations du gène SPG4 : haploinsuffisance VS gain de fonction pathologique »

> Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay Préparée à l'Université EVRY VAL D'ESSONNE

École doctorale n°577 Structure et dynamique des systèmes vivants Science de la vie et de la santé, Neurosciences

Spécialité de doctorat: Biologie moléculaire et neurosciences

Thèse présentée et soutenue à Evry, le 27 Novembre 2017, par

## **Clément Plaud**

#### Composition du Jury :

Afsaneh, GAILLARD Pr au LNEC (INSERM U-1084), Poitiers Annie, ANDRIEUX DR à UMRS-1216 (INSERM), Grenoble Frederic DARIOS CR à ICM (INSERM), Paris Christian, POÜS DR à UMRS-1193 (INSERM), Paris sud Coralie FASSIER CR à UMRS-8246 (INSERM), Paris Patrick, CURMI Président d'université à UMRS-1204, Evry Andrea, BURGO MCU à UMRS-1204 (INSERM), Evry

Rapporteur
Rapporteur
Président du Jury
Examinateur
Examinateur
Directeur de thèse
Co-Directeur de thèse

### Résumé et abstract

Résumé : Les paraplégies spastiques héréditaires (PSHs) forment un large groupe de maladies génétiques caractérisées par une dégénérescence des fibres sensitives ascendantes et des axones des neurones moteurs centraux contrôlant les mouvements volontaires. Les patients souffrent d'une paralysie progressive des membres inférieurs (formes pures) couplée dans certains cas à des troubles cérébraux (formes complexes). Les mutations du gène SPAST (SPG4) codant pour la protéine spastine sont responsables de plus de 40 % des formes pures autosomiques dominantes des PSHs. Cette protéine a pour fonction le clivage des microtubules et contrôle par ce biais différents processus cellulaires associés à leurs dynamiques d'assemblage. A ce jour plus de 300 mutations de la spastine ont été répertoriées, la plupart touchant le domaine enzymatique responsable du clivage. Cependant, les liens entre mutants et les différents degrés de sévérité pathologique ne sont pas connus. Pour expliquer l'apparition et/ou la progression de cette pathologie, deux mécanismes ont été proposés : une réduction du clivage dû à la réduction de l'expression de la spastine (haploinsuffisance), ou l'apparition d'une fonction toxique de certains mutants de cette protéine. En raison de la grande longueur des axones des neurones moteurs, les défauts de transport ont été proposés pour expliquer la survenue de dilatations axonales observés chez certains patients et dans différents modèles cellulaires.

A l'aide de neurones de souris mimant l'effet d'haploinsuffisance, nous avons démontré que l'absence de spastine entraîne une augmentation sélective de l'acétylation des microtubules au niveau axonal. Cet effet est associé à une augmentation de la vitesse du transport antérograde des vésicules membranaires contenant la protéine VAMP7, une v-SNARE impliquée dans la croissance axonale et l'expansion membranaire. Nos résultats suggèrent que l'acétylation des microtubules jouerait un rôle critique dans la sélectivité du transport antérograde via le jeu des moteurs moléculaires de type kinésines. Dans notre cas, l'acétylation affecte KIF5A, une kinésine dont la fonction est majoritairement liée au transport de VAMP7. Des déséquilibres du transport de composés nécessaires au métabolisme cellulaire et à la survie de l'axone induiraient la dégénérescence de l'afférence neuronale. Dans un second temps, nous avons généré différentes constructions sauvages et mutées des formes longue (M1) et courte (M87) de la spastine afin d'éclaircir leurs localisations et leurs fonctions cellulaires. Il a été démontré précédemment que certaines mutations faux-sens génèrent des protéines M1 associées à un sous-ensemble de microtubules et incapables de les cliver, ce qui pourrait expliquer leurs effets néfastes sur la dynamique des microtubules. Il faut noter qu'une même mutation affecte de la même façon les formes M1 et M87, codées par le même gène. Le rôle de l'isoforme M87 dans l'apparition ou la progression de PSHs est encore méconnu. Nos données montrent que les isoformes M1 et M87 porteuses d'une même mutation forment des fagots sur des sousensembles distincts de microtubules. Elles ind uisent aussi une augmentation significative de

l'acétylation de la tubuline dépendante de l'enzyme  $\alpha$ TAT1. Cependant, les fagots associés à la protéine M87 mutée apparaissent moins résistants aux agents pharmacologiques utilisés dans cette étude et ne semblent pas se produire pas sur nos cultures de neurones. Par l'augmentation de l'acétylation et la formation de fagots, les mutants perturbent néanmoins la stabilité du réseau de MTs ce qui pourrait influencer le transport de composés le long de l'axone. Le trafic axonale de VAMP7 est ainsi fortement affecté au niveau des microtubules décorés par la protéine M1 mutée. Ces données confortent l'hypothèse que les mutants de M1 joueraient un rôle majeur dans l'apparition des PSHs liées à la spastine.

Abstract: Hereditary spastic paraplegias (HSPs) are a group of heterogeneous inherited disorders characterized mainly by a progressive lower limb spasticity and weakness due to a degeneration of ascending sensory fibers and corticospinal tract axons. Mutations in the SPAST (SPG4) gene, which encodes for the spastin protein, are the most common causes of autonomic dominant HSPs and account for 40% of pure autosomic dominant HSPs cases. By its ability to sever microtubules spastin can regulates their dynamics and thereby different cellular process depending on the microtubules network. To date, more than 300 mutations have been identified for spastin, and most of them affect the enzymatic activity of the AAA ATPase spastin domain responsible for microtubules severing. Up to now, no functional links have been identified between the type of mutation and the severity of clinical symptoms of HSPs. Two mechanisms have been proposed as a cause for the HSP linked to SPASTmutations: the first one relies on the reduction of the expression levels of this protein, i.e. haplo-insufficiency; the second suggests a "negative gain-of-function" for some spastin mutations. At the cellular level, deficit in axonal transport has been proposed as a main cause in the onset of the disease and to account for the axonal swelling, the prominent pathological phenotype observed in patients and neuronal models carrying SPAST mutations.

Using a neuronal mouse model of SPG4 which reproduce the haploinsufficiency mechanism of the pathology, we demonstrated that the anterograde velocity of membrane cargos containing VAMP7, a v-SNARE implicated in axonal growth and membrane homeostasis, is enhanced within axons. We showed further that the level of acetylated tubulin is significant increased in this model. These results suggest that the lack or impairment of spastin expression induces a moderate increased level of acetylated tubulin accompanied by an enhanced activity of molecular motors of the kinesin-1 family and as a consequent an increase of the anterograde velocity of axonal cargoes such as VAMP7 vesicles. The alterations of these molecular mechanisms may be involved in the formation of axonal swelling and overall in the onset and/or progression of the SPG4-linked neurodegeneration. We also generated here different constructs of the longest (M1) and shorter (M87) isoforms of spastin in order to enlighten the subcellular localization and function of the wild-type and mutants' forms of these proteins. Indeed, it has been shown that some mutations of SPG4 led to inactive M1 spastin that decorate a subset of microtubules. These mutants may be implicated in the negative gain of function mechanism as stated above. In addition, it is worthy to note that a same mutation can both affect the M1 and M87 spastin isoforms but to date the role of M87 in the onset and progression of HSPs is largely unknown. In the present work; we showed that M1 and M87 carrying the same mutation decorate two different subset of microtubules bundles. Both mutants induce an increase of the level of acetylated tubulin depending on the activity of the  $\alpha$ TaT1 enzyme. However, microtubule bundles decorated by the mutated M1 are more resistant to different pharmacological treatment than microtubules decorated by the mutated M87. Moreover, the latter seems not to induce bundles in cortical neurons in culture. The increases of tubulin acetylation and

the formation of microtubule bundles induced by spastin mutants may perturb axonal transport which may be implicated in the negative gain of function mechanism of these mutants. Interesting, the axonal transport of VAMP7 vesicles is strongly impaired along microtubules decorated by M1 mutants. In conclusion these data suggest and reinforce the hypothesis that mutants of M1 spastin are primarily involved in the onset and/or progression of HSPs linked to SPG4.

# Table des matières

Résumé et abstract1
Table des matières
Table des illustrations 8
Liste des tableaux 11
Liste d'abréviations 12
Remerciements
Introduction générale 15
Etat de l'art 17
I. Le contrôle des mouvements par le cortex moteur 17
II. Le tractus corticospinal et les neurones corticaux
III. Les microtubules
a. Architecture et fonction 22
b. Dynamique cellulaire liée aux MTs 23
c. Modifications post-traductionnelles de la tubuline
IV. Les axones et le transport axonal 30
V. Le réticulum endoplasmique 31
VI. Complexité des PSHs : un cadre génétique et protéique complexe
VII. La spastine
a. Les différentes isoformes de spastine et l'activité de clivage
i. Domaines
ii. Formation d'hexamère et accrochage aux MTS42
iii. La fonction de clivage
iv. Interaction avec des partenaires et impact sur les voies cellulaires
b. Les mutants pathologiques 48
i. Haploinsuffisance VS Gain de fonctions neurologiques
ii. Modèles développés
iii. Les gonflements axonaux : une piste de thérapie et un lien avec d'autres maladies neurodégénératives
c. Objectif de la Thèse 55
Matériels et méthodes

I.	٦	Fechniques de biologie moléculaire et cellulaire	56
	a.	Liste des produits et constructions utilisés	56
	b.	Production des protéines	5 <i>9</i>
	i.	Insertion de l'ADN dans le plasmide:	5 <i>9</i>
	<i>ii</i> .	. Amplification : Maxipréparation d'ADN plasmidique	50
	с.	Culture de lignées immortelles : HeLa	5 <b>0</b>
	i.	Protocole de transfection	51
	<i>ii</i> .	. Immunofluorescence	52
	ii	i. Technique de Western Blot	53
	iv	v. Extraction d'ARN	55
П.	E	Expérimentation animale	55
	a.	Modèle animal : souris SPG4 Knock-Out	<b>55</b>
	b.	Neurones corticaux	5 <b>6</b>
	i.	Technique d'extraction des neurones corticaux	56
	ii	. Culture et transfection des neurones	57
III.		Différences entre les types cellulaires	57
IV	. ſ	Vicroscopie à fluorescence	58
V.	١	/idéomicroscopie	59
VI	. r	Mesure des ratios de fluorescence	59
Résu	Ita	ts	73
l. ne	F urc	Partie 1 : L'absence d'activité de la spastine régule le transport de VAMP7 dans de ones corticaux	es 73
	a.	Le ratio tubuline acétylée/tubuline totale augmente dans les neurones SPG4-KO	74
	b. mite	L'absence de spastine a une influence variable sur le transport de VAMP7, VAMP2 et d ochondries	es 79
	с. ахо	Effets des drogues ciblant les MTs (MTA) sur l'homéostasie neuronale et sur le transpo nal	ort 84
II.	F	Partie 2 : Des mécanismes de régulation affectent différemment les mutants fai	XL
se	ns o	de la spastine et suffisent à l'apparition de phénotypes pathologiques	<b>)1</b>
	a. spa	Importance des domaines N-Terminal et AAA-ATPase dans la localisation de la protéi stine et de ses mutants.	ne 91
	b. mut	L'acétylation des MTs ne régule pas la localisation des isoformes porteuses de tation C445Y1	la 01
	с.	Les mutants spastine augmentent significativement le niveau d'acétylation des MTs1	06

d. phi	Les fagots induits par M1CY sont plus résistants à différentes traitements armacologiques			
е.	Formation de l'hexamère pathologique119			
f.	La présence de mutants spastine à un effet fonctionnel néfaste sur le transport axonal. 120			
Discussion et conclusions				
I.	Absence d'activité de la spastine : effet sur l'acétylation et sur le transport axonal 122			
ll. l'hon	Gain de fonction pathologique : l'absence de clivage de la spastine perturbe néostasie cellulaire126			
Référei	nces bibliographiques131			

# Table des illustrations

Figure 1 : Reproduction de l'homonculus moteur (Penfield et al, 1957)	18
Figure 2 : Représentation du tractus corticospinal et des voies de projection des axones (image	
adaptée depuis le site « studyblue.com »)	20
Figure 3 : Schéma récapitulatif de la contraction du muscle squelettique (livre de physiologie	
humaine, Sherwood, 2 <sup>ème</sup> édition)	21
Figure 4 : Assemblage des tubulines en protofilaments constituants les MTs (Westermann et al.	
2003)	23
Figure 5 : Dynamique de formation des MTs et équilibre polymérisation-dépolymérisation	
(Akhmanova et al. 2008)	25
Figure 6 : Distribution des différentes MPTs sur les dimères de tubulines $\alpha$ et $\beta$ (Janke et al. 2014).	28
Figure 7 : Au sein d'un neurone donnée, les MPTs varient selon la région considérée et la maturité	du
neurone (Song et al. 2015).	29
Figure 8 : Structure des kinésines et dynéines responsables du transport de cargos, adaptée du site	
internet de Cell Biology group project	31
Figure 9 : Réticulum endoplasmique et membrane nucléaire (image adaptée depuis le site de	
l'université de l'état de Floride)	32
Figure 10 : Mécanismes moléculaires participant à la formation du réseau du réticulum (Goyal et al	
2013)	34
Figure 11 : Structure 3D d'une protéine spastine et d'un hexamère (Roll-Mecak et al. 2008)	38
Figure 12 : L'interaction de la spastine et de la queue C-terminale de la tubuline est nécessaire pour	r
le clivage (Sharp et al. 2012).	39
Figure 13 : L'activité de clivage de la spastine et de la katanine permet d'induire une nouvelle	
dynamique d'assemblage et de désassemblage des microtubules (Roll-Mecak et al. 2010)	39
Figure 14 : Les isoformes de spastine : domaines et fonctions protéiques (Solowska et al. 2015)	42
Figure 15 : Simulation informatique de la formation d'hexamère de spastine (Eckert et al. 2013)	43
Figure 16 : Cycle de l'hexamère de spastine et de la consommation d'ATP (Wen et al. 2013)	44
Figure 17 : Les spastine sauvages M1 et M85 clivent les MTs	46
Figure 18 : Plusieurs types de mutations de la spastine affectent les patients	49
Figure 19 : La réduction d'activité de la spastine entraîne la formation de dilatations axonales	
(Tarrade et al. 2006)	54
Figure 20 : Représentation schématique des constructions spastine utilisées dans cette étude	56
Figure 21 : Séquence des plasmides utilisés pour la réalisation des constructions GFP et Flag	58
Figure 22 : Schéma représentant l'insertion d'un fragment ADN au sein d'un plasmide	59
Figure 23 : Protocole de transfection des cellules avec la Lipofectamine2000 (Invitrogen)	62
Figure 24 : Représentation du montage pour le transfert des protéines depuis le gel SDS-page sur u	ne
membrane de nitrocellulose (abcam)	64
Figure 25 : Exemple de génotypage réalisé au laboratoire	66
Figure 26 : Schéma d'un microscope à épifluorescence (collège national des enseignants et praticie	ns
de génétique médicale)	68
Figure 27 : Exemple de quantification du signal d'immunofluorescence	71
Figure 28 : Deux exemples de kymographe utilisés dans cette expérience	72

Figure 29 : Les neurones dépourvus de spastine montrent une augmentation spécifique du ratio
tubuline acétylée/tubuline totale
Figure 30 : L'acétylation de la tubuline observé dans des neurones SPKG4-KO est plus faible qu'une
acétylation induite par un traitement à la TSA76
Figure 31 : Conformément à nos résultats obtenus en Western Blot, l'absence d'expression de la
spastine augmente l'acétylation (échelle = 20 μm)77
Figure 32 : L'absence de production de la Spastine ne semble pas influencer le niveau d'expression
d'autres protéines impliquées dans la dynamique des microtubules
Figure 33 : Suivi de la dynamique de vésicules positives à VAMP2 ou VAMP7 par analyse de
kymographes (échelle = 20 μm)
Figure 34 : L'absence de spastine augmente le transport antérograde des vésicules VAMP7 par le
biais de l'augmentation de l'acétylation
Figure 35 : Le transport de VAMP2 n'est pas affecté par l'acétylation induite par l'absence de
spastine
Figure 36 : La déplétion de spastine n'a pas d'effet sur le transport des mitochondries le long des
axones (échelle = 20 μm)
Figure 37 : Etude de la dynamique des MTs (échelle = 20 μm).
Figure 38 : L'effet du Taxol sur la morphologie des neurones et la distribution des MPTs est « dose-
dépendant »
Figure 39 : L'effet du Nocodazole sur la morphologie des neurones et la distribution des MPTs est
« dose-dépendant »
Figure 40 : Les traitements Taxol et Nocodazole perturbent l'équilibre des MPTs dans l'axone
Figure 41 : Le Taxol ne compense pas l'augmentation de vitesse de transport de VAMP7 induite par
l'absence de spastine
Figure 42 : Schéma des constructions spastine utilisées dans nos travaux
Figure 43 : Les mutants spastine décorent des sous-ensembles de MTs différents dans les cellules
HeLa
Figure 44 : Le domaine hydrophobe présent dans la partie N-Terminale force la localisation de la
construction au sein de la membrane du RE96
Figure 45 : La protéine sauvage M1, mais pas M85, se localise sur la membrane extérieure des
gouttelettes lipidiques
Figure 46 : Les isoformes de mutants spastine M1 mais pas de M85 décorent les MTs dans les
neurones corticaux de souris
Figure 47 : M1CY et M85CY décorent différentes sous-unités de MTs différentes dans les cellules
HeLa et les neurones corticaux
Figure 48 : La construction M85CY-GFP forme rapidement et sélectivement des fagots de MTs en
périphérie de la cellule
Figure 49 : Les constructions mutées spastine-GFP colocalisent partiellement avec la tubuline
acétylée
Figure 50 : L'altération des niveaux de tubuline acétylée ne modifie pas la localisation des
constructions mutées de la spastine (échelle = 20 μm)104
Figure 51 : La surexpression de lysine non acétylable n'altère pas la localisation des mutants spastine.

Figure 52 : La formation de fagots de MTs induit une augmentation de l'acétylation des MTs dans les
cellules HeLa
Figure 53 : Les mutants spastine n'affectent pas le niveau de tubuline tyrosinée
Figure 54 : Les mutants spastine maintiennent leurs localisations spécifiques et l'augmentation
d'acétylation des MTs même après 48h de transfection109
Figure 55 : L'acétylation induite par les mutants spastine dépend de l'activité d' $\alpha$ TaT et d'HDAC6. 111
Figure 56 : Les MTs positives à la spastine M1CY sont plus résistant à la dépolymérisation induites par
le Nocodazole
Figure 57 : Les fagots positifs à M1CY récupèrent plus rapidement après un traitement au froid que
ceux positifs à M85CY115
Figure 58 : Les fagots positifs à M1CY récupèrent plus rapidement après un traitement au NaCl que
ceux positifs à M85CY116
Figure 59 : Les fagots positifs à M1CY mais pas à M85CY ou à M1Δ sont résistants aux traitements
NaCl et au froid
Figure 60 : La variation de force ionique induite par le sucrose délocalise fortement M85CY mais pas
M1CY
Figure 61 : Le mutant M1CY seul est capable de recruter la forme sauvage M1
Figure 62 : L'expression de M1CY et de M1∆ affecte le nombre et la vitesse de transport des vésicules
positives à VAMP7121
Figure 63 : Schéma récapitulatif et modèle appuyé par les résultats de nos travaux
Figure 64 : La complexité de l'interaction RE-MTs au sein des fagots positifs aux mutants joue un rôle
dans la différence de résistance129

# Liste des tableaux

Tableau 1 : Quatre protéines sont principalement impliquées dans les PSHs autosomique	
dominantes, adaptée de (Lo Giudice et al. 2014)	36
Tableau 2 : Récapitulatif des fonctions des protéines et de leur importance dans l'homéostasie	
cellulaire, adaptée de (Lo Giudice et al. 2014)	36
Tableau 3 : Récapitulatif des données présentes dans la littérature sur l'effet de la réduction de	
clivage par la spastine sur la dynamique axonal	53
Tableau 4 : Exemple de protocoles réactionnels utilisés et ses variations selon les différentes	
conditions expérimentales	61

### Liste d'abréviations

- AAA = ATPase associée à différentes activités cellulaires
- aTAT = alpha tubuline acétyltransférase
- **ATP =** adenosine triphosphate
- **ARN =** acide ribonucléique
- **GABA** = acide γ-aminobutyrique
- **GDP** = guanosine diphosphate
- **GFP =** green fluorescent protein
- **GTP =** guanosine triphosphate
- HDAC = histone désacétylase
- MAP = protéine associée aux microtubules
- **MIT =** microtubule interacting domain
- MPTs = modification post-translationnels de la tubuline
- MTBD = microtubule interacting and biding domain
- MTs = microtubules
- NTer = N-Terminale domaine
- **PSHs =** paraplégie spastique héréditaire
- **RE =** réticulum endoplasmique
- **RFP =** red fluorescent protein
- **SPG4 =** spastin gate 4
- **TSA =** trichostatin A
- VAMP7 = vesicle associated membrane protein 7

### Remerciements

Ce travail n'aurait pas été possible sans le soutien de la région île de France, à travers l'organisme DIM cerveau et pensée, dont l'aide financière m'a permis de me consacrer entièrement à l'élaboration de ma thèse.

Je souhaite remercier chaleureusement les membres du jury qui ont accordé du temps et de l'intérêt à mon travail de thèse. Je remercie la Docteure Afsaneh GAILLARD et la Docteure Annie ANDRIEUX d'avoir accepté d'être mes rapporteurs et pour leurs commentaires concernant mon manuscrit.

Je remercie le Docteur Christian POÜS d'avoir accepté d'être examinateur de ma thèse et pour les discussions et conseils scientifiques qui m'ont permis d'avancer dans cette thèse.

Je remercie le Docteur Frederic DARIOS et le docteur Coralie FASSIER d'avoir accepté d'être examinateur de mon travail de thèse.

Je remercie mon directeur de thèse le Docteur Patrick CURMI, Président de l'Université d'Evry Val d'Essonne, pour ses conseils scientifiques, pour sa présence et ses conseils lors de la rédaction de ma thèse. La disponibilité dont vous avez fait preuve et la clarté de vos recommandations m'ont toujours permis de faire rapidement avancer mon projet.

J'adresse mes remerciements les plus sincères à mon co-directeur de thèse le Docteur Andrea BURGO de m'avoir offert l'opportunité de réaliser cette thèse. Mes plus sincères et chaleureux remerciements pour la confiance que vous m'avez accordé et pour votre patience, votre disponibilité, et vos conseils qui m'ont permis de réaliser tous ces travaux et de cadrer efficacement ce sujet si vaste et complexe.

Je tiens à remercier tous les membres de l'unité U1204 pour leur accueil et leurs enseignements dispensés tout le long de ma thèse. Je remercie plus particulièrement Mme Vandana JOSHI pour tous les travaux qu'elle a effectués et qui ont permis cette thèse, pour ses suggestions et son aide. Un grand merci également à Mme Lydia LEBOUIL pour sa disponibilité, pour ses réponses à mes questions et pour son efficacité à régler les problèmes qui se sont posés durant ces trois ans.

Je remercie Regis, Alix, Imane et Manel pour nos échanges scientifiques, nos pauses, nos rires. Un travail de thèse ne serait pas ce qu'il est sans ces moments que nous avons partagés.

Merci à tous mes amis qui ont supporté des heures interminables d'explication de mon sujet. Je sais que très peu ont compris tant la science et plus particulièrement ce type de sujet est un autre univers, mais ça a été agréable de partager un peu de cette aventure avec vous. Je remercie plus particulièrement Mr François NIBAUDEAU pour la patience dont il a fait preuve à corriger cette thèse.

Merci à Mme Gwennaëlle SOURTY pour ton soutien sans lequel je n'aurais pas présenté ce travail, pour ta gentillesse et ton courage à la lecture de cette thèse où tu ne comprenais pas beaucoup de mots. Je sais que partager ma vie avec toi fais de moi le plus heureux des docteurs.

Enfin je remercie ma famille qui, bien que divisée, a toujours été là pour moi. Le départ de cette aventure a été compliqué mais le soutien que vous m'avez communiqué et l'intérêt que vous avez porté à ce travail m'ont donnés la force d'arriver au bout.

### Introduction générale

Les paraplégies spastiques héréditaires (PSHs), aussi appelées maladies de Strumpell-Lorrain, forment un large groupe de neuropathologies génétiques décrites dès la fin du XIXème siècle. Il reste néanmoins difficile d'associer clairement un syndrome clinique au groupe des PSHs. Les principales caractéristiques cliniques sont :

- une rigidité musculaire
- > une faiblesse progressive des membres inférieurs

Les études post-mortem de patients PSHs ont montrées principalement une dégénérescence axonale des neurones du cortex moteur au niveau du tractus corticospinal (constatée au maximum jusqu'au niveau de la moelle épinière thoracique), et, dans une moindre mesure, une dégénérescence globale des axones au sein du *fasciculus gracilis* (observée au maximum jusqu'au niveau de la région cervicale). Il est intéressant de noter que très peu de mort de cellules neuronales a été rapportée, caractérisant ce type de pathologie comme des axonopathies génétiques (Fink et al. 2013). Les PSHs sont des maladies rares, avec une prévalence variant de 1,2 à 9,6 pour 100 000 individus en Europe. Pour la France, les chiffres de prévalence, probablement sous-estimés, indiqueraient 30 patients par millions soit environ 2000 personnes atteintes. Le mode de transmission génétique des PSHs varie selon les mutations : autosomique dominante (une copie mutée du gène suffit pour développer la pathologie, ce qui représente environ 70% des cas de PSHs), autosomique récessive (environ 25% des cas, deux copies mutées sont nécessaires) ou même liés au chromosome X (moins de 5%).

Actuellement, plus de 70 loci génétique (Novarino et al. 2014; Lo Giudice et al. 2014) ont été recensés définissant autant de types de PSHs monogéniques différents. Chaque type de PSHs peut se manifester cliniquement soit pendant l'enfance (20% des PSHs sont dites juvéniles) soit à l'âge adulte (80% des cas pathologiques). Le niveau d'handicap du patient est corrélé uniquement au degré d'atteinte de la moelle épinière (pour les formes pures) ou couplé à la présence de troubles neurologiques cérébraux (les formes complexes s'associent avec des cas d'ataxie, d'épilepsie, de retard mental ou de dégradation cognitive). De plus, le degré de progression pathologique d'un mutant varie selon la résistance naturelle des patients (de faiblesse musculaire à paralysie progressive). Tout ceci contribue à définir un cadre complexe dans lequel il n'existe aujourd'hui pas de liens direct entre le type monogénique de PSHs (par exemple la SPG4), une mutation touchant la protéine cible (exemple : une des 300 mutations répertoriées sur la protéine spastine), et les éléments physiopathologiques observés chez le patient frappé de PSHs (raideur musculaire ou paralysie complète). En raison de cette grande complexité des PSHs, il n'existe aujourd'hui que des traitements palliatifs visant à réduire la rigidité et la faiblesse musculaire. Différentes molécules sont ainsi utilisées par voie orale ou par injection intrahécale dans le but de réduire la réponse calcique source de la contraction du muscle squelettique, de favoriser l'entrée du chlore et l'extinction de la réponse musculaire (agoniste du récepteur GABAb) ou enfin d'activer une cascade cellulaire couplée aux protéines G, réduisant l'activité du système nerveux central (agoniste  $\alpha$ 2-adrénergique). Dans certains cas, une injection locale de toxine botulique permet d'inhiber la libération d'acétylcholine au niveau de jonctions neuromusculaires et ainsi de contrôler la contraction des muscles visés (Fink et al. 2013).

Le gène SPG4, codant pour la protéine spastine (Sp), fut découvert en 1999 (Hazan et al. 1999). Démontré comme étant impliqué dans 40% des formes pures et dans 20% des formes complexes (Lo Giudice et al. 2014), c'est la principale cause connue de cas de PSHs autosomique dominante. Plusieurs isoformes de la protéine existent, toutes responsable du clivage des microtubules. Plus de 300 mutations ont été répertoriées sur la spastine, la plupart touchant le domaine responsable de cette fonction enzymatique. Peu d'informations permettent à ce jour d'éclairer les mécanismes moléculaires permettant de comprendre les liens entre mutations de la spastine et pathologie. Différents modèles laissent penser que la perturbation du transport axonal joue un rôle important dans la mise en place de la dégénérescence. On ne sait cependant pas encore si c'est la réduction de production de protéines (effet d'haploinsuffisance) ou bien la présence du mutant lui-même par un « gain de fonction » qui serait à l'origine des effets neurotoxiques.

Une lignée de souris SPG4 knock-out a été développé au sein du laboratoire SABNP par l'équipe du professeur Melki (Tarrade et al. 2006). En s'appuyant notamment sur ce modèle murin, cette thèse vise à évaluer l'impact sur le transport axonal de différents cargos de l'absence de spastine ou de l'expression de mutants associés à la pathologie humaine. Nous avons également cherché à éclaircir les mécanismes cellulaires et moléculaires mis en jeu, et d'analyser l'effet de protéines associées aux microtubules (MAP) sur la localisation différentielle de ces constructions.

Les résultats obtenus ont permis de lier la réduction de la spastine à une perturbation locale de l'acétylation des microtubules. Les cargos véhiculés par des moteurs moléculaires spécifiques, sensibles aux niveaux de cette MPTs, voient leurs transports déréglés. De même, il apparait que l'expression de mutants induit une augmentation d'acétylation des microtubules et jouerait un rôle dans la réduction du transport axonal. La diversité de localisation des isoformes, ainsi que leurs capacités à répondre différemment aux traitements suggèrent la mise en place de voies de régulation biochimiques différentes. Nos travaux s'inscrivent dans un contexte où les données de différentes sources suggèrent l'existence de liens spécifiques entre mutations de la spastine et phénotype définies. Nos résultats contribuent à cette dynamique en tentant d'associer des mécanismes cellulaires à des isoformes mutées. La perspective de relier à long terme les phénotypes cliniques aux effets cellulaires induit par une mutation permettra d'enrichir les données utiles à la recherche thérapeutique et au développement de traitements préventifs ou curatifs.

### Etat de l'art

#### I. Le contrôle des mouvements par le cortex moteur

Le contrôle de l'activité musculaire squelettique est sous la dépendance de l'activation cérébrale des aires du néocortex qui permettent la planification, le contrôle et l'exécution du mouvement volontaire. Le cortex moteur peut être divisé en différentes régions :

- Le cortex moteur primaire : aussi appelé aire 4 de Brodmann ou gyrus précentral. En 1957, la stimulation électrique de ces zones par Penfield déclenche des contractions musculaires très localisées et permet de dessiner le 1<sup>er</sup> homonculus moteur (voir Figure 1, p.18). Le cortex moteur primaire initie une grande partie des influx nerveux transitant le long de la moelle épinière. Il est impliqué dans l'exécution du mouvement, mais d'autres aires cérébrales participent également à cette fonction.
- L'aire prémotrice : intégrée dans l'aire 6 de Brodmann du cortex. Elle contribue à l'intégration des informations sensorielles dans la préparation et l'orientation du mouvement. L'aire prémotrice est le plus souvent impliquée dans le contrôle des muscles proches de l'axe du corps.
- L'aire motrice supplémentaire : seconde partie de l'aire 6. Cette aire est impliquée dans la planification de mouvements complexes et la coordination d'actions impliquant les deux mains.

Les informations sensorielles, auditives et visuelles contribuent à définir le cadre du mouvement et jouent un rôle dans son contrôle. Dans le cadre des PSHs, la dégénérescence axonale débute principalement au niveau du tractus corticospinal, un élément constitutif de la moelle épinière.



Figure 1 : Reproduction de l'homonculus moteur (Penfield et al, 1957). Par stimulation corticale directe, il a été démontré un lien entre un mouvement spécifique et l'activation d'une aire motrice précise. Les surfaces allouées sur le cortex sont proportionnelles à la complexité des mouvements effectués.

#### II. Le tractus corticospinal et les neurones corticaux

Un neurone est une cellule spécialisée dans le traitement et/ou la transmission d'informations. À cette fonction spécifique est associée une forme particulière du neurone, qui possède un corps cellulaire (le soma) entouré de plusieurs ramifications plus ou moins longues. Les ramifications plutôt courtes sont appelées dendrites et servent à la fois à communiquer comme à se nourrir. En règle générale, l'axone est le canal de transmission de l'information, le « bras » le plus long du neurone. En connectant leurs dendrites à différents axones, les neurones forment un réseau sophistiqué redistribuant l'information dans les différentes aires cérébrales.

Il existe plusieurs types de neurones, classés selon leurs fonctions ou selon les aires cérébrales dans lesquelles ils interviennent. Durant la gastrulation, des gradients de molécules sécrétées (comme les BMP, Wnt ou SHH) permettent la différenciation d'une partie du tissue en neuro-ectoderme aussi appelé plaque neurale. Durant l'étape de

Page **19** sur **144** 

neurulation, cette plaque va former le tube neural et la crête neurale, points clés permettant la régionalisation des aires cérébrales. Depuis l'épithélium de la zone bordant les ventricules, la neurogenèse est mise en place au travers d'une prolifération massive des cellules souches et de la formation de progéniteurs neuronaux. La migration de ces progéniteurs à l'extérieur de la zone ventriculaire permet l'assemblage en 6 couches corticales superposées du cortex cérébral (Angevine et al. 1961). La différentiation du progéniteur en neurone s'effectue une fois l'implantation réalisée au sein d'une couche corticale (Rakic et al. 1988). L'atteinte des neurones corticaux et de leurs axones est un phénomène commun à de nombreuses conditions pathologiques comme les lésions (vasculaires, traumatiques) ou des maladies neurodégénératives (PSHs, sclérose latérale amyotrophique, maladie d'Alzheimer ...). Chez les mammifères, les axones les plus longs proviennent des neurones pyramidaux du cortex moteur et participent à l'élaboration et au contrôle du mouvement. Ces cellules sont majoritairement de type glutamatergique, capables de « dialoguer » notamment avec des neurones cholinergiques situés au sein de la moelle épinière qui assurent le passage de l'information motrice aux cellules musculaires. Le tractus corticospinal fait partie, tout comme le tractus corticobulbaire, du faisceau pyramidal qui contrôle l'ensemble de la motricité volontaire. Chez l'Homme, le tractus corticospinal forme une voie qui relie les corps cellulaires des neurones pyramidaux, localisés dans la couche V du cortex moteur, aux motoneurones et interneurones périphériques nécessaires à la préhension et à la locomotion.

La représentation de la Figure 2 (voir p.20) montre les axones des neurones moteurs centraux qui décussent en grand nombre au niveau médullaire pour former le tractus latéral. Les axones conservés en ipsilatéral constituent le tractus ventral. L'ensemble de ces axones établissent des synapses directement ou indirectement au niveau de la corne antérieur de la moelle épinière avec les neurones moteurs périphériques. Ces derniers font synapse sur les jonctions neuromusculaires et régulent la contraction des muscles squelettiques. Le tractus corticospinal est un des plus grand neurotractus chez l'homme. Le faible nombre d'intermédiaires y assure une transmission très rapide du signal. La longueur des axones des neurones moteurs centraux peut atteindre 1 mètre. Ces axones sollicitent une machinerie complexe et fonctionnelle afin d'assurer une bonne distribution des protéines et des organelles. Dans le cadre des PSHs, la dégénérescence axonale est communément située au niveau des synapses des neurones moteurs centraux ou dans la partie de l'axone proche de celle-ci. L'évolution de la maladie correspond à la remontée progressive de cette altération le long de la moelle épinière.



Figure 2 : Représentation du tractus corticospinal et des voies de projection des axones (image adaptée depuis le site « studyblue.com »).

Le tractus corticospinal rassemble les fibres axonales des neurones du cortex moteur qui projettent le long de la moëlle épinière pour innerver différents muscles squelettique. Ces neurones centraux (upper motoer neuron) contactent des interneurones périphériques (lower motor neuron) responsable de la traduction du signal et du contrôle de la contraction musculaire.

L'envoi d'un stimulus par un groupe de neurones situés au niveau du cortex moteur primaire induit la libération d'acétylcholine au niveau de la jonction neuromusculaire (voir Figure 3, p.21). La liaison de ce neurotransmetteur aux récepteurs nicotiniques conduit à l'ouverture de canaux ioniques et la formation d'un potentiel d'action musculaire. Cette dépolarisation de la membrane se transmet de proche en proche jusqu'au sein des tubules T, des extensions du réticulum qui pénètrent à l'intérieur de la cellule musculaire. Cela permet la sortie de calcium des stocks intracellulaires responsable de la contraction des filaments actine-myosine.

Le contrôle des mouvements passe par la régulation de l'activité des neurones cholinergiques : l'inhibition d'une réponse musculaire antagoniste à l'action désirée est aussi importante que l'activation d'un muscle agoniste.



Figure 3 : Schéma récapitulatif de la contraction du muscle squelettique (livre de physiologie humaine, Sherwood, 2<sup>ème</sup> édition).

L'influx nerveux se traduit en libération d'acétylcholine grâce à l'intermédiaire d'un interneurone périphérique, ce qui permet la stimulation de récepteurs spécifiques et la formation d'un potentiel de membrane (1). Ce potentiel d'action atteint les tubules transverses et libère le calcium contenu dans le réticulum sarcoplasmique (2). Le calcium se lie à la troponine (3) et permet la contraction (4). La hausse du calcium stimule des mécanismes d'extinction du signal (5) et de relaxation (6).

La spécialisation de l'axone dans la transmission de données a nécessité des adaptations morphologiques spécifiques. En particulier l'uniformisation de l'orientation des MTs axonaux avec leur extrémités négatives dirigées vers le corps cellulaire et leur extrémités positives orientées vers la terminaison axonale (Burton et al. 1981; Heidemann et al. 1981). On sait depuis 1964 que les MTs neuronaux ne sont rattachés à aucun centre organisateur défini (Lyser et al. 1964, 1968 ; Baas et al. 2016) mais sont pourtant stabilisés au niveau de leurs extrémités négatives. Lorsqu'un microtubule ou un de ces domaines est stable, les échanges de tubuline entre ses sous-unités et le stock de tubulines libres (phénomènes de polymérisation ou de dépolymérisation) se font beaucoup plus lentement (Li et al. 1996). La croissance d'un MT axonal est donc limité à l'allongement de ces domaines stables (Baas et al. 2016).

### III. Les microtubules

#### a. Architecture et fonction

Absents chez les procaryotes, les microtubules (MTs) sont des fibres essentielles à l'intégrité du cytosquelette des cellules eucaryotes. Ce sont des tubes creux polaires d'un diamètre d'environ 25 nm (Appert-Rolland et al. 2015) et d'une longueur variable en fonction de l'équilibre de polymérisation - dépolymérisation. Ancrés sur le centrosome dans les cellules non neuronales, les MTs rayonnent dans tout le cytoplasme et sont fondamentales pour :

- > L'organisation intracellulaire et le maintien de l'intégrité de la cellule
- > La mitose via la ségrégation des chromosomes
- > La motilité des flagelles et des cils chez les eucaryotes
- > Le transport intracellulaire d'organelles et de vésicules

Les briques élémentaires des MTs sont les hétérodimères  $\alpha$  et  $\beta$  d'une protéine globulaire nommée tubuline. Les isoformes  $\alpha$  et  $\beta$  ont une forte homologie (près de 50% de leurs acides aminés sont identiques) observée en 1998 par cristallographie (Nogales et al. 1998). Leur auto-assemblage longitudinal compose le protofilament qui constitue la paroi des MTs entourant la lumière centrale (voir Figure 4 ci-dessous). En moyenne, le tube creux du microtubule est formé par 13 protofilaments associés latéralement (Westermann et al. 2003). Les interactions latérales entre tubulines se font entre mêmes isotypes ( $\alpha$ - $\alpha$  et  $\beta$ - $\beta$ ) sauf au niveau de la ligne de structure, représentée par une flèche noire en Figure 5a (voir p. 25), où il existe un décalage entre les protofilaments et qui permet une interaction  $\alpha$ - $\beta$ . L'alignement et l'orientation des protofilaments permettent de polariser les MTs, et l'écart induit par la ligne de structure permet la formation de deux extrémités aux propriétés différentes :

- > L'extrémité positive expose les sous-types de tubuline  $\beta$ . La dynamique d'assemblage y est rapide
- > L'extrémité négative met en avant les sous-types de tubuline  $\alpha$  et où la dynamique d'assemblage est plus lente



Figure 4 : Assemblage des tubulines en protofilaments constituants les MTs (Westermann et al. 2003).

Les dimères de tubuline  $\alpha$  et  $\beta$  s'assemblent naturellement pour former des protofilaments longitudinaux. L'interaction latérale entre tubulines respecte le motif  $\alpha$ - $\alpha$  ou  $\beta$ - $\beta$ . C'est le regroupement de 13 protofilaments constitue le microtubule.

#### b. Dynamique cellulaire liée aux MTs

L'ajout d'hétérodimères de tubuline est appelé polymérisation, alors que l'événement contraire est nommé dépolymérisation. Les dimères de tubuline, de par leur activité GTPasique, régule la polymérisation des MTs via une première étape de nucléation consistant à l'assemblage d'oligomères  $\alpha$  et  $\beta$ . Dans une seconde phase nommée élongation, les dimères de tubuline sont ajoutés aux extrémités des MTs, définissant une vitesse d'élongation liée à la concentration du stock de tubuline libre disponible. L'état d'équilibre est une phase stationnaire intermédiaire dans laquelle les MTs sont « en pause », les étapes de polymérisation ou de dépolymérisation se compensant. Lors de la formation d'un hétérodimère de tubuline la sous-unité  $\alpha$  es toujours associée à une molécule de GTP. A l'inverse, la sous-unité  $\beta$  peut contenir une molécule de GTP ou de GDP en fonctions des concentrations locales de ces nucléotides. Lors de la polymérisation, l'ajout des hétérodimères couplés à la GTP peut se faire aux deux extrémités des MTs (voir Figure 5, p.25). La présence de tubuline-GTP au niveau de l'extrémité d'un microtubule engendre une « coiffe » qui stabilise le complexe. Le retrait de celle-ci par l'action d'hydrolyse de la sousunité  $\beta$  (Linse et al. 1988) favorise les événements de dégradation (catastrophe). Les extrémités négatives ou positives sans coiffe sont donc plus sensibles aux événements de dépolymérisation.

Les phénomènes de catastrophes (induction d'une dépolymérisation) ou de sauvetages (récupération de la polymérisation) vont jouer un rôle dans l'équilibre des MTs. Ces

phénomènes ont des causes diverses comme : la variation de concentration locale de la tubuline libre, la présence de MAPs ou de protéines déstabilisatrices des MTs, l'action de drogue, etc ... L'alternance entre croissance et effondrement des MTs est appelée « instabilité dynamique » (Mitchison et al. 1984). De manière autonome, les MTs modifient donc naturellement leurs tailles et jouent ainsi un rôle fondamental et régulateur sur les fonctions cellulaires qui peuvent leur être associées.

*In vivo*, l'organisation dynamique des MTs ainsi que leurs polarités contribuent à la régulation du transport intracellulaire de multiples composés et organelles et dans le choix de la direction de transport (antérograde ou rétrograde). Plusieurs familles de protéines interagissent directement avec les MTs et régulent leurs dynamiques :

- Des protéines comme les EBs ou CLIMP se fixent aux extrémités et jouent un rôle dans la stabilisation, favorisant alternativement les événements de sauvetage ou de catastrophe
- Des protéines associées aux MTs (MAPs), comme Tau, qui aident à la stabilité locale du microtubule en dehors d'une extrémité
- Des protéines déstabilisatrices comme la katanine ou la spastine, capables de cliver les MTs et d'induire des dépolymérisations

La présence de protéines capables de cliver les MTs, comme la spastine ou la katanine, permettent aussi de réguler localement leurs dynamiques. L'impact de certaines modifications post-traductionnelles de la tubuline, très présentes au niveau des MTs axonaux, semblent notamment pouvoir affecter les capacités physiologiques de ces protéines (Valenstein et al. 2016).



Figure 5 : Dynamique de formation des MTs et équilibre polymérisation-dépolymérisation (Akhmanova et al. 2008).

L'ajout de dimères de tubuline-GTP permet l'élongation du microtubule (A). Ici ancrés par leurs extrémités négatives, l'ajout d'hétérodimères se fait au niveau de l'extrémité positive. Les MTs sont soumis à des événements de polymérisation (croissance) ou de dépolymérisation (décroissance) qui participent à la dynamique globale des microtubules (B).

#### c. Modifications post-traductionnelles de la tubuline

Les modifications post-traductionnelles de la tubuline (MPTs) sont des processus biochimiques dynamiques, souvent réversibles, qui affectent les propriétés d'une protéine par l'ajout ou la soustraction d'un groupement ou d'une autre molécule à un résidu aminé (voir Figure 6, p.28). Il existe plusieurs sortes de MPTs impactant directement la tubuline libre ou indirectement les MTs. Ces modifications peuvent varier selon les types et la maturité des cellules (Janke 2014). Les principales MPTs que nous évoquerons ici sont :

Le phénomène réversible de tyrosination et de détyrosination : Ce phénomène a été découvert il y a plus de 40 ans (Barra et al. 1973) et est la MPTs la mieux caractérisée à l'heure actuelle. L'incorporation de la tyrosine se fait directement au cours de la traduction de l'ARN de la tubuline. La plupart des tubulines ont ainsi une tyrosine au niveau de leurs extrémités C-Terminale. La détyrosination, phénomène de retrait du groupement tyrosine (Hallak et al. 1977), est opérée par une enzyme

nommée tubuline carboxypeptidase (TCP) très récemment identifiée (Aillaud et al. 2017). Le retrait de ce groupement expose les glutamates composant la queue de la tubuline, ce qui protège les microtubules de la dépolymérisation et favorise donc la longévité sans rendre les MTs plus stables (Webster et al. 1990). Cette détyrosination est réversible avec l'activité d'une enzyme TTL qui permet à la cellule de rajouter un nouveau groupement tyrosine à une fibre détyrosinée (Raybin et al. 1977; Schröder et al. 1985; Ersfeld et al. 1993). Les fibres détyrosinées peuvent être aussi converties en  $\Delta 2$ -tubuline par un retrait irréversible d'un résidu glutamate situé sur la tubuline  $\alpha$ (Paturle et al. 1989; Paturle et al. 1991). Dans les neurones, les ∆2-tubuline sont restreintes aux microtubules très stables, suggérant que cette MPTs confère certaine propriétés liées à la stabilisation (Paturle-Lafanechère et al. 1994). Les cycles de détyrosination/tyrosination mis en place par la cellule sont nécessaires dans le contrôle de différentes interactions moléculaires. Par exemple, les protéines de la famille des +TIPs sont sensible à la présence de tyrosine sur les queues C-terminale des tubuline et vont permettre de contrôler l'architecture cellulaire et de réguler la dynamique des MTs (Akhmanova et al. 2008). Dans cette famille, une majorité des +TIPs porte un domaine associé au cytosquelette et enrichi en glycine (CAP-Gly). Le résidu tyrosine a été démontré comme essentiel pour l'interaction de ce domaine CAP-Gly avec les MTs (Weisbrich et al. 2007). De plus, la détyrosination des MTs peut abolir le suivi des protéines CAP-Gly sur les extrémités positives des MTs, ce qui peut avoir un lien important dans la régulation des fonctions de ces protéines (Peris et al. 2006; Bieling et al. 2008). Le contrôle des ratios de tubuline tyrosinée/détyrosinée est également nécessaire dans le développement embryonnaire (Erck et al. 2005; Marcos et al. 2009) ou dans l'activité de clivage de la spastine, qui clive plus spécifiquement les MTs détyrosinées (Roll-Mecak et al. 2008).

L'acétylation : l'acétylation affecte le réseau de MTs stable mais n'est pas considéré comme la cause de la stabilisation du MT (Palazzo et al. 2003). Le site d'acétylation de la tubuline est positionné dans la lumière du MTs au niveau de la Lys-40 sur la tubuline α (LeDizet et al. 1987; Nogales et al. 1998). Il est encore difficile d'expliquer le rôle de l'acétylation de la tubuline en considérant que la plupart des protéines associées aux MTs se localisent sur la face extérieur du tube. Cependant, de nouveaux sites d'acétylation ont été identifiés (Choudhary et al. 2009), dont certains exposés sur la face extérieure des MTs, laissant penser que cette MPTs est aussi capable de réguler directement des interactions protéines-MTs. L'ajout d'un groupement acétyle est opéré, sur la tubuline, par l'activité d'enzymes nommées α-tubuline acétyle-transférase (αTaT) et plus particulièrement par l'αTaT1 très largement exprimée dans différents modèles cellulaires (Shida et al. 2010). Les enzymes de la famille des HDAC, comme HDAC6, sont considérés comme des

désacétylases capables du retrait du groupement acétyle et dont l'inhibition contribue à augmenter significativement les niveaux de MTs acétylées dans les neurones (Haggarty et al. 2003; Hubbert et al. 2003). L'acétylation des MTs pourrait stimuler sélectivement certains transports intracellulaires via une hausse de l'affinité de fixation des moteurs moléculaires comme les kinésines-1 (Reed et al. 2006; Konishi et al. 2009) ou la dynéine (Dompierre et al. 2007; Alper et al. 2014). Cette MPTs affecterait également l'activité de clivage de la katanine mais pas celui de la spastine (Sudo et al. 2010; Valenstein et Roll-Mecak 2016). L'acétylation des microtubules pourrait aussi servir de signal vital dans la différentiation neuronal et la bonne formation des dendrites. Une étude a montré que les enzymes acétyltransférases nommées ARD1 et NAT1, acétylant initialement les histones, étaient capables de former un complexe et d'acétyler la tubuline (Park et al. 1992). Cette acétylation a été démontrée comme importante dans l'extension et l'arborisation du réseau de neurites, tout comme dans la différentiation des neurones corticaux (Creppe et al. 2009).

La polyglutamylation : Elle se caractérise par l'ajout de glutamates sur les queues des tubuline  $\alpha$  ou  $\beta$  conduisant à la formation d'une seconde queue C-terminale (Eddé et al. 1990; Alexander et al. 1991; Rüdiger et al. 1992). Les grands taux de longues chaines de glutamates sont souvent trouvés dans les centrioles (Bobinnec et al. 1998), les cils et flagelles (Fouquet et al. 1994) ou sur les MTs neuronales suggérant une régulation clé des fonctions associées (Audebert et al. 1993; Audebert et al. 1994). Les enzymes impliquées dans la polyglutamylation de la tubuline possèdent un domaine TTLL, pour « tubulin tyrosine ligase-like », qui va, selon le type de domaine, ajouter un certains nombres de glutamate sur la queue C-terminale de la tubuline ou préférer un monomère de tubuline particulier (Regnard et al. 2003; Janke et al. 2005; Ikegami et al. 2006; van Dijk et al. 2007; Janke et al. 2008). Bien que le phénomène de déglutamylation est été observé (Audebert et al. 1993), l'enzyme impliqué n'est actuellement pas connue. La complexité de la polyglutamylation des MTs et l'accessibilité de ces sites suggèrent que la polyglutamylation est un mécanisme important dans la régulation fine des interactions entre les microtubules et ses partenaires. Il a été ainsi observé que la polyglutamylation semblait permettre une meilleure fixation aux microtubules de la plupart des MAPs et des kinésines (Larcher et al. 1996; Bonnet et al. 2001). Dans un modèle de souris génétiquement dépourvus des complexes TTLL1 (Campbell et al. 2002), la localisation neuronal de KIF1A, mais pas celles des kinésines KIF3A ou KIF5, est altérée ce qui souligne la capacité des TTLL à influencer les kinésines (Ikegami et al. 2007). Au sens large, des études ont démontrées que la polyglutamylation était capable de réguler le trafic et les moteurs moléculaires associés, kinésines comme dynéine, affectant ainsi les fonctions cellulaires associées comme la fonction synaptique (Ikegami et al. 2007; Maas et al. 2009; Kubo et al. 2010). De plus, la longueur de la queue C-terminale des MTs est importante dans l'interaction de la spastine avec les MTs (Lacroix et al. 2010) et ce facteur réglementerai même le clivage de la protéine de manière non linéaire (Valenstein et al. 2016).



Figure 6 : Distribution des différentes MPTs sur les dimères de tubulines  $\alpha$  et  $\beta$  (Janke et al. 2014).

Les isotypes de tubuline  $\alpha$  et  $\beta$  subissent différentes modifications post-transrationnelles qui contribuent à la mise en place de mécanismes spécifiques. Seuls les phénomènes d'acétylation affectent la tubuline  $\alpha$ , au niveau de la Lysine-K40 ou du site intraluminale K252. Les effets de polyamination et de phosphorylation touchent la tubuline  $\beta$  respectivement au niveau des sites Q15 et S172. Enfin, certaines MPTs sont conjointes aux deux types de tubuline comme la polyglycylation, la polyglutamylation, la tyrosination et la détyrosination. Ces dernières jouent sur des sites situés sur les queues carboxy-terminales des tubulines et ont un rôle important dans la régulation de facteurs cellulaires clés (Erck et al. 2005; Marcos et al. 2009; Roll-Mecak et al. 2008; Lacroix et al. 2010; Valenstein et al. 2016).

Toutes ces MPTs peuvent jouer sur la charge de la queue C-terminale ou plus directement sur des sites spécifiques agencés sur la tubuline. Elles sont très conservées au cours de l'évolution, mais leurs ratios varient en fonction de la maturité de la cellule (voir Figure 7, p.29). Dans les neurones en développement, les niveaux d'acétylation, de glutamylation et de détyrosination sont élevés dans l'axone en extension, alors qu'ils sont réduits dans le cône de croissance. L'absence ou le faible niveau d'acétylation au sein de cette zone en développement est cohérent avec la présence de MTs fortement dynamique nécessaire à son expansion. Au contraire, les neurones matures montrent une altération quantitative et qualitative des MPTs. L'acétylation, par exemple, est plus présente dans les compartiments cellulaires (dendrites, axones, terminaisons), dans lesquelles la réduction de la dynamique des MTs est nécessaire à la mise en place de connections stables entre les neurones. Il apparaît ainsi qu'une coordination des MPTs permet une régulation fine des fonctions et des mécanismes cellulaires. La grande variétés de MPTs influencent de manière complexe le recrutement des moteurs moléculaires (Westermann et al. 2003; Hammond et al. 2008; Lacroix et al. 2010; Valenstein et al. 2016), ou d'autres protéines associées aux MTs comme les MAPs (Atherton et al. 2012). C'est donc un point important dans le cadre de cette thèse.



Figure 7 : Au sein d'un neurone donnée, les MPTs varient selon la région considérée et la maturité du neurone (Song et al. 2015).

La maturation d'un neurone est caractérisée par la variation de niveaux de MPTs clés comme l'acétylation, la glutamylation et la tyrosination. Celle-ci permet le passage d'un système « dynamique » en expansion (élongation des neurites et de l'axone, mouvement du cône de croissance) à un système « figé » (connections des dendrites, formation et stabilisation des synapses).

#### IV. Les axones et le transport axonal

Au sein du neurone, la production de protéines est réalisée majoritairement au niveau du corps cellulaire. De plus, l'homéostasie varie entre les différents compartiments (neurites, soma et axones). La nécessité d'adressage des composés fabriqués par le réticulum impliquent des mécanismes de transport différents. Les microtubules sont fondamentaux dans ces phénomènes de transport pour la communication à double sens et continuent à être un point crucial dans la survie du neurone ainsi que dans le maintien du fonctionnement de l'axone et de la synapse.

Le transport axonal antérograde (du soma vers la périphérie) permet un ravitaillement continu de l'axone et de sa terminaison et est assuré majoritairement par les moteurs moléculaires de type kinésine. Les kinésines sont des protéines capables de se déplacer sur les microtubules en présence d'ATP et surtout de lier un cargo permettant son transport. Réparties dans 45 familles chez l'homme, la famille des kinésine-1 est la plus étudiée (De Vos et al. 2008). Chez l'humain, les kinésines sont des structures dimériques constituées de 673 acides aminés (voir Figure 8, p.31). Chaque monomère est composé de chaîne légère (64 kDa), d'une partie intermédiaire de chaînes légères entremêlées et de chaînes lourdes (124 kDa). Les chaînes lourdes sont les « têtes » de la kinésine, permettant l'accrochage aux MTs et l'action motrice via la dégradation de l'ATP. Il existe une grande homologie de structure pour cette région motrice entre les différentes familles de kinésines. Au contraire, les chaînes légères attachent les cargos à déplacer sur la kinésine et, de par leurs grandes différences structurelles, confèrent une forte spécificité de transport en fonction de chaque famille de protéine. Le transport antérograde de différents organites est ainsi modulé en fonction du type de kinésine exprimé localement. Le déplacement est directement lié à la consommation d'ATP, dont l'hydrolyse projette la tête d'un des monomères et anime une semi-rotation à l'origine d'une marche « pas à pas ». La vitesse de mouvement varie selon la concentration d'ATP mais aussi de la charge portée par la kinésine. Ces deux paramètres peuvent induire un détachement de la kinésine ou simplement un phénomène de pause pendant lequel la protéine reste inactive sur le MT.

Le transport rétrograde, quant à lui, permet le retour des molécules membranaires vers le corps cellulaire afin qu'elles y soient dégradées, voire recyclées. De plus, des molécules, absorbées au niveau des terminaisons, peuvent remonter jusqu'au soma et informer la cellule sur ce qu'il se passe à la périphérie ou jouer un rôle trophique. Ce sont les dynéines cytoplasmiques qui sont responsables de ce type de transport. Ces complexes protéiques, d'environ 2 MDa, sont composés de chaînes lourdes, de chaînes intermédiaires, et de chaînes légères. Comme pour les kinésines, les chaînes lourdes (520 kDa) forment la « tête » responsable de la fixation aux MTs et de l'activité motrice par consommation d'un ATP. Les chaînes légères et intermédiaires, via le recrutement de la dynactine, assurent le recrutement et le transport du cargo. La dynactine est une protéine nécessaire pour la

fixation du cargo et est donc un point majeur dans la régulation d'activité de la dynéine. Les différences de spécificité de transport sont liées aux adaptateurs recrutés par la dynactine ce qui, comme pour les kinésines, assure selon l'expression un transport spécifique.



Figure 8 : Structure des kinésines et dynéines responsables du transport de cargos, adaptée du site internet de Cell Biology group project.

Les kinésines sont responsables du transport antérograde d'un large panel de molécules. L'hydrolyse de l'ATP projette la tête d'un des monomères et anime une semi-rotation à l'origine d'une marche « pas à pas ». Les dynéines suivent le même principe de mouvement mais transportent les composés en direction rétrograde.

### V. Le réticulum endoplasmique

Le réticulum endoplasmique (RE) est un système membranaire en continuité avec le noyau qui se répartit uniformément sur l'ensemble du cytoplasme (voir Figure 9, p.32). Vital dans la synthèse des protéines, le RE joue également un rôle important dans la dynamique des flux calciques ainsi que dans la synthèse et le transport des lipides. C'est donc un organe important pour la cellule, et tout effet sur sa dynamique peut avoir de lourdes conséquences à de multiples niveaux.



Figure 9 : Réticulum endoplasmique et membrane nucléaire (image adaptée depuis le site de l'université de l'état de Floride).

Le RE est un système membranaire en continuité avec le noyau. Le RE rugueux (rough) est caractérisé par la présence de nombreux ribosomes qui assurent la synthèse de protéines. Le RE lisse (smooth) sert pour le conditionnement et l'envoi de protéines au Golgi.

Deux types de réticulum existent :

- le RE rugueux est constitué d'un empilement d'enveloppes aplaties caractérisé par la présence de ribosomes qui confèrent cet aspect granuleux. Les ribosomes assurent, via des complexes de protéines et d'ARN, la synthèse de protéines destinées à la sécrétion ou possédant des domaines hydrophobes.
- le RE lisse sert de lieu de conditionnement et d'expédition des protéines. La formation de vésicules de transport à partir de la membrane du réticulum permet ainsi l'encapsulage et l'adressage de protéines au Golgi (pour les étapes de maturation).

Le réseau de tubules du RE lisse, d'un diamètre de 30 à 100 nm, semble incorporer des motifs en « plaques » d'un diamètre allant de 50 à 100 nm (Goyal et al. 2013). La formation des tubules peut passer par :

l'attachement à un microtubule en cours de polymérisation (TAC mechanism). Des complexes de protéines d'attachement (TAC) poussent le stock de tubuline libre à s'ajouter au niveau des extrémités des MTs (voir Figure 10b, p.34). Le MT et le tubule se forment donc tous deux en parallèle. l'accrochage à un microtubule stable (sliding mechanism). Celui-ci sert de tuteur. L'extension du tubule est régulée par différents moteurs moléculaires (voir Figure 10b, p.34).

Plusieurs familles de protéines sont nécessaires à la stabilisation du RE (Voeltz et al. 2006). La famille des réticulons, par exemple, est capable d'interagir avec l'atlastine et de former des points de jonctions entre les tubules. La surexpression de RTN4a dans des cellules de mammifères augmente le nombre de tubules et réduit la présence de plaques du RE (Voeltz et al. 2006). L'équilibre entre plusieurs formes de ces protéines peut donc permettre de jouer un rôle crucial dans la stabilisation et la composition du réticulum.

Le réticulum endoplasmique est également un organe « vivant » et dynamique, toujours en cours de remodelage. Les phénomènes de fortes courbures de la membrane permettent l'interaction de protéines et l'activation de différentes voies de signalisation cellulaires. Les plaques du réticulum sont notamment supposées être fortement chargées en protéines médiatrices de cette dynamique. L'impact de protéine comme la spastine, capable d'interagir avec des partenaires au sein du RE et d'induire le remodelage, est un élément d'intérêt dont on ignore cependant l'impact dans les cadre des PSHs (Renvoisé et al. 2010).



Figure 10 : Mécanismes moléculaires participant à la formation du réseau du réticulum (Goyal et al. 2013).

Schéma du réseau de tubules et des plaques du réticulum endoplasmique lisse (A). Mécanismes impliqués dans la formation et l'extension du réticulum, accolé aux microtubules stabilisées (B). Les protéines de la famille des réticulons et l'atlastine interagissent pour former des connexions entre les tubules (C). Les protéines présentes en surface et dans la lumière du réticulum permettent sa formation et sa stabilisation (D).

#### VI. Complexité des PSHs : un cadre génétique et protéique complexe

Les PSHs forment un large groupe de pathologies rares et monogéniques. Celles-ci sont caractérisées par une dégénérescence progressive des axones des neurones corticaux centraux et par la mise en place d'une atteinte musculaire allant de la rigidité à la paralysie. On estime que 2000 personnes sont atteintes de PSHs en France mais la complexité de ces maladies les rend complexes à diagnostiquer. La complexité des PSHs vient de la difficulté à clairement pouvoir les définir. La majorité des cas pathologiques se transmettent de manière génétique au sein des familles et plus de 70 loci génétique ont été répertorié, définissant autant de PSHs différentes (Novarino et al. 2014; Lo Giudice et al. 2014). Un type de PSHs est équivalent à l'altération d'un gène codant pour une protéine spécifique. Complexifiant encore plus cette définition globale, les protéines mutées peuvent être impliquées dans une large gamme de fonctions cellulaires comme :

- transport axonal
- remodelage du réticulum endoplasmique
- fonctionnement des mitochondries
- > myélinisation
- > repliement de protéines et réponse au stress du réticulum
- > métabolisme des acides gras et des phospholipides
- > trafic membranaire endosomal et formation de vésicules
- guidage axonal

Parmi les cas familiaux, ceux à transmission autosomique dominante représente la majorité des cas recensés chez les patients. Quatre types de PSHs (Blackstone et al. 2010) représenteraient les protéines majoritairement impliquées dans ces formes de PSHs (voir Tableau 1 ci-dessous). Bien qu'ayant un lien commun dans la dynamique du réticulum endoplasmique, l'atteinte pathologique de ces protéine montre des différences dans l'âge de départ des pathologies, dans les types de mutations impliquées, mais aussi dans les phénotypes associés (voir Tableau 2, p.36). Si l'on se concentre sur la spastine, la protéine la plus impliquée dans le cadre des PSHs, plus de 300 mutations ont été répertoriées (The human gene mutations database HGMD). La capacité de ces mutations a toucher les différents domaines des protéines contribue à perturber différentes fonctions cellulaires (Lo Giudice et al. 2014). Elles sont cependant regroupées dans le même type de PSHs malgré des différences de symptômes observables entre patients. Pour résumer sur cette complexité des PSHs, il n'existe pas à l'heure actuelle de liens entre :

- > Le grand nombre de type de PSHs. Par exemple la PSH-SPG4
- Une mutation touchant la protéine. Une des 400 mutations répertoriées sur la protéine spastine
- Les observations cliniques. Les patients SPG4, ou porteurs d'une même mutation de la spastine, ne montrent pas les mêmes symptômes pathologiques. Ceux-ci peuvent aller de la raideur musculaire à la paralysie complète.

Cet échelonnage en cascade contribue à la mise en place du cadre pathologique complexe et de la difficulté à définir les PSHs. Il n'existe ainsi que des traitements palliatifs visant à réduire la rigidité et/ou la faiblesse musculaire. Une prise en charge paramédicale via des actes de kinésithérapie ou d'hydrothérapie permet le maintien de l'activité physique la plus fonctionnelle possible. Dans certains cas, une injection sélective de toxine botulique peut permettre d'inhiber localement la libération d'acétylcholine au niveau de la jonction neuromusculaire (Fink et al. 2013). Enfin, différentes molécules sont utilisées par voie orale ou par injection intrahécale dans le but de :

- > réduire la réponse calcique entraînant la contraction du muscle squelettique
- permettre l'entrée de chlore pour inhiber la réponse musculaire (agoniste du récepteur GABAb)
- réduire l'activité du système nerveux central en activant une cascade cellulaire couplée aux protéines G (agoniste α2-adrénergique).

Туре	Gène/Protéine	MT	Âge	Phénotype	ТоМ
SPG3A	ATL1/ATLASTIN-1	AD	EO	P or C	PM
SPG4	SPAST/SPASTIN	AD	VO	P or C	PM, ss, del, dupl, ins
SPG8	KIAA0196/STRUMPELLIN	AD	AO	Р	PM, del
SPG31	REEP1/REEP1	AD	EO	P or C	PM, del, ss, ins

Tableau 1 : Quatre protéines sont principalement impliquées dans les PSHs autosomique dominantes, adaptée de (Lo Giudice et al. 2014).

AO = âge adulte ; AD = autosomique dominant ; C = complexe ; del = délétion ; dupl = duplication ; EO = âge précoce ; ins = insertion ; MT = mode de transmission ; P = pure ; PM = mutation ponctuelle ; ToM = type de mutations ; ss = mutation du site d'épissage; VO = âge variable.

Туре	Fonctions	Effets additionnels pathologique	Références
SPG3A	Croissance des neurites, trafic membranaire, remodelage du RE et du Golgi	Atrophie des muscles inférieurs, épilepsie, ataxie, OA, spasticité des membres supérieurs, PNP des axones sensorimoteur, perte cognitive, TCC	(Zhao et al. 2001)
SPG4	Dynamique des MTs, trafic membranaire, morphogénèse du RE, signalisation BMP	perte cognitive, épilepsie, ataxie, psychose, spasticité des membres supérieurs, PNP, tremblements des mains, WMLs, amyotrophie des muscles de la main	(Hazan et al. 1999)
SPG8	Morphogénèse des endosomes, repliement des protéines	-	(Valdmanis et al. 2007)
SPG31	Activités chaperonnes, morphogénèse du RE	PNP, ataxie cérébrale, tremblements, démence, amyotrophie des muscles de la main	(Züchner et al. 2006)

Tableau 2 : Récapitulatif des fonctions des protéines et de leur importance dans l'homéostasie cellulaire, adaptée de (Lo Giudice et al. 2014).

BMP = bone morphogenic protein ; OA = atrophie optique ; PNP = polyneuropathie ; TCC = thin corpus callosum ; WMLs = lésion de la matière blanche.

#### VII. La spastine

Notre travail s'intéresse à la spastine, une protéine de la famille des AAA (activités associées au domaine ATPase) agissant sur les microtubules. Les membres de cette famille, porteurs d'un domaine capable de fixer et d'hydrolyser l'ATP, sont impliqués dans plusieurs fonctions cellulaires allant de la réplication de l'ADN au clivage des MTs, en passant par la dégradation de protéines. L'hydrolyse de l'ATP permet d'induire un changement de conformation, traduit en force mécanique qui a un effet sur la molécule cible. Les protéines AAA varient selon leurs activités, leurs stabilités et leurs mécanismes. Notre travail s'intéresse plus particulièrement aux mutants spastine dépourvus d'activité enzymatique. Beaucoup d'éléments restent encore à comprendre concernant l'importance de la localisation cellulaire, l'effet sur la fonction enzymatique, la capacité d'interaction avec des partenaires,

ou toutes autres implications pathologiques que peuvent avoir les mutations frappant cette protéine.

Je rapporterai ci-dessous une partie des points d'intérêts « majeurs » considérés actuellement dans le cadre des études relatives à la spastine. L'ensemble des aspects connus ne seront pas cependant abordés, comme la possible capacité de localisation nucléaire de la spastine sous certaines conditions (Charvin et al. 2003; Errico et al. 2004; Beetz et al. 2004).

# a. Les différentes isoformes de spastine et l'activité de clivage

Le gène SPG4 humain, d'une taille d'environ 90 kb, est localisé au niveau du chromosome 2p21-p22 (Hazan et al. 1999). La présence de deux codons d'initiation permet la production de deux isoformes majoritaires de la spastine nommées M1 et M87 (Claudiani et al. 2005). L'épissage alternatif de l'exon 4 conduirait à la production de deux autres isoformes moins étudiés (Claudiani et al. 2005). Les deux spastine M1 et M87 conservent la plupart de leurs domaines en communs, et pourraient conserver les mêmes fonctions cellulaires liées à la dynamique des microtubules. D'un point de vue structural, c'est l'absence des 86 premiers acides aminés qui définit la différence entre les spastine M1 et M87. Des études ont pointées du doigt la différence de localisation cellulaire entre M1 inséré dans la membrane du réticulum endoplasmique et M87 cytosolique. Mais aussi la différence d'expression tissulaire chez l'Homme à l'âge adulte où l'isoforme M87 est retrouvée dans l'ensemble de l'organisme. Au contraire de la forme M1, que l'on estimerai plus concentrée dans la moelle épinière (Solowska et al. 2008) ou au moins plus abondante dans l'ensemble du système nerveux central (Claudiani et al. 2005).

Lors du développement, une étude chez la souris suggère que le niveau de spastine varie peu entre l'âge embryonnaire et l'adulte (Solowska et al. 2008). A l'inverse, le niveau d'expression de la katanine, une autre AAATPase impliqué dans le clivage des MTs, chuterai fortement au cours du développement jusqu'à passer sous les valeurs de la spastine rendant cette dernière AAATPase majoritaire chez l'adulte.

Des études de cristallographie et de bio-informatique ont permis de modéliser la structure de la protéine et de ses différents domaines (voir Figure 11, p.38). La fonction principale de clivage nécessite, pour les deux isoformes, la formation d'un hexamère (voir Figure 12, p.39). Cette activité de clivage des microtubules est importante pour permettre une nouvelle dynamique cellulaire (voir Figure 13, p.39). Une nouvelle coiffe GTP se forme sur les extrémités des microtubules « libérés » par la spastine ce qui permet l'ajout de nouveaux hétérodimères de tubuline et entraine une nouvelle dynamique d'extension (Roll-Mecak et al. 2010). Bien que les deux isoformes soient capables d'assurer cette fonction, la spastine M1 semble avoir une activité enzymatique plus faible comparé à celle de M87 (Solowska et al. 2010).

L'absence de ces 86 premiers acides aminés semble donc suffisant pour induire des différences importantes entre les isoformes M1 et M87 tant par le contrôle de l'expression tissulaire, que par la spécificité de localisation cellulaire ou par l'impact sur l'activité de clivage. Cette différence entre isoformes est un point à étudier plus en détails dans le cadre des mutants spastine afin de comprendre si cela peut avoir une importance dans la mise en place de la pathologie.



Figure 11 : Structure 3D d'une protéine spastine et d'un hexamère (Roll-Mecak et al. 2008).

A gauche, la structure 3D d'une protéine. A droite, un hexamère formé de six protéines et donc les deux faces sont exposés. N = domaine N-terminal présent uniquement dans la protéine M1; NBD et HBD = constitue le domaine enzymatique responsable du clivage.



Figure 12 : L'interaction de la spastine et de la queue C-terminale de la tubuline est nécessaire pour le clivage (Sharp et al. 2012).

L'hexamère (A) peut se fixer à plat contre les MTs (i) ou perpendiculaire à celle-ci (ii). La régulation du clivage passerait par plusieurs points clés (B) : la localisation interne ou sur une extrémité du MTs (1), la localisation au niveau de MPTs (2), l'inhibition stérique via la présence de protéines associées aux MTs.



Current Opinion in Cell Biology

Figure 13 : L'activité de clivage de la spastine et de la katanine permet d'induire une nouvelle dynamique d'assemblage et de désassemblage des microtubules (Roll-Mecak et al. 2010).

Les microtubules sont représentés par les protofilaments en vert avec l'ajout de tubuline libre (flèche noire) et la stabilisation de l'extrémité négative par un centrosome (en rouge). L'hexamère de spastine (en bleu) se fixe aux MTs, induit un clivage et une nouvelle dynamique de polymérisation (flèche noire en extrémité positive) mais aussi de dépolymérisation (flèche noire en extrémité négative).

#### i. Domaines

La spastine comporte plusieurs domaines d'importances aujourd'hui toujours très étudiés (voir Figure 14, p.42) :

- Le domaine N-Terminal. Il comprend les 86 premiers acides aminés et est spécifique à la spastine M1. Ce domaine comprend une région hydrophobe transmembranaire (aa 49-80) capable d'adresser la protéine au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique. Le lien entre la spastine M1 et le réticulum endoplasmique pourrait contribuer à expliquer la réduction d'effet de clivage observer par rapport à la forme M87. Cela permettrait aussi le remodelage de la membrane du RE (notamment via l'interaction avec des protéines partenaires comme REEP1, atlastine ou RTN1). Enfin, la présence de la séquence hydrophobe semble nécessaire pour localiser la spastine au sein des gouttelettes lipidiques (Papadopoulos et al. 2015).
- Le MIT (microtubule interacting and trafficking) organisé en 3 hélices se situe entre les résidus 116 à 197 (Ciccarelli et al. 2003). Ce domaine est conservé entre les différentes isoformes mais a aussi été décrit sur d'autres protéines et est connu pour interagir avec un groupe de protéine appelé CHMPs (Hurley et al. 2008). Par l'interaction avec des partenaires, la spastine développe un large panel de capacités cellulaire. L'interaction avec des protéines impliquées dans le complexe ESCRT-III, comme CHMP1B (Reid et al. 2004) ou IST1 (Connell et al. 2009; Allison et al. 2017), permettrait à la spastine d'exercer une fonction critique sur certains processus cellulaires comme la cytokinèse (Yang et al. 2008; Connell et al. 2009), la tubulation des endosomes (Allison et al. 2013), le désassemblage du fuseau mitotique et le scellage de l'enveloppe nucléaire (Vietri et al. 2015).
- Le MTBD (microtubule binding domain, résidus 270 à 328) est essentiel pour l'interaction de la spastine avec les microtubules et cela de manière indépendante à l'ATP (White et al. 2007). C'est également l'un des domaines nécessaires à l'activité physiologique de clivage de la protéine, conjointement avec la cassette AAA. Ces deux domaines vont permettre la formation de l'hexamère, la fixation aux microtubules et le clivage.

- ► Le domaine AAA (ATPase associated with diverse cellular activities, résidus 342 à 599) est commun à une large famille de protéines ATPases (White et al. 2007). Il contient un domaine  $\alpha$  de liaison de l'ATP (aussi appelé motif de Walker A, séquence en acides aminés « GPPGNGKT », résidus 382 à 389), un domaine  $\beta$  d'hydrolyse de l'ATP (aussi nommé motif de Walker B, séquence en acides aminés « IIFIDE », résidus 437 à 442), et une séquence consensus minimale d'activité enzymatique (résidus 480 à 498). Ce domaine permet l'activité enzymatique de la protéine spastine.
- Signaux de localisation cellulaire (NLS et NES). Des études ont montrées la présence de deux NLS (Nuclear Localization Signal) localisés au niveau des exons 1 et 6 (Beetz et al. 2004), dont le premier spécifique à la région N-terminale présente uniquement sur la spastine M1. De même, deux NES (Nuclear Export Signal) ont été rapportés dans cette région spécifiquement exprimée chez M1 (Claudiani et al. 2005). A l'heure actuelle, peu de choses sont connue sur la capacité des isoformes de spastine à se localiser à l'intérieur du noyau et sur l'effet développé par cette protéine.

Bien que la fonction enzymatique connue de cette protéine se résume aujourd'hui à sa capacité à cliver les MTs, les différents domaines imposent un cadre fonctionnel spécifique. En fonction de l'interaction avec les MTs (MTBD), de la présence de partenaires (MIT) ou de l'insertion dans la membrane du RE, la spastine voit son activité de clivage régulée. Les parties suivantes vont permettre de définir plus profondément les connaissances actuelles sur la formation de l'hexamère, sur la fonction de clivage, et sur l'impact du recrutement de partenaires connus. Toutes ces fonctions, définies par les différents domaines que nous venons de voir, pourraient être affectées dans des cas pathologiques de PSHs.



Figure 14 : Les isoformes de spastine : domaines et fonctions protéiques (Solowska et al. 2015).

Séquence d'exons du gène SPG4 codant pour la protéine spastine (A). Représentation des différents domaines fonctionnels (B) : N-Term = domaine N-Terminal d'adressage à la membrane du réticulum, MIT = microtubule interacting and trafficking domain, MTBD = microtubule binding domain, AAA = domaine ATPase contenant la fonction enzymatique. Schéma des deux isoformes majoritaires de la spastine, M1 et M87 (C). La région rose pâle représente l'exon 4 qui, s'il est retiré, permet la production des deux variants d'épissage de M1 et de M87.

#### ii. Formation d'hexamère et accrochage aux MTS

La formation de l'hexamère est un point clé du mécanisme de fonctionnement de la spastine toujours mal compris de nos jours. La spastine étant une protéine complexe, l'hexamère peut être constitué de plusieurs isoformes de protéines différentes, et ceci selon plusieurs types de conformation (Eckert et al. 2013). Il est important de garder cela à l'esprit, notamment lorsque l'on considère les mutants spastine tels que ceux que nous verrons ciaprès, car la capacité de clivage de l'hexamère final peut être impactée (Pantakani et al. 2008). Une simulation informatique a analysé la dynamique d'assemblage des monomères (voir Figure 15, ci-après) et propose que l'hexamère se forme par : un ajout successif de monomères, une fusion de dimères ou un assemblage de trimères. Cet éclairage ne permet cependant toujours pas de comprendre plus en profondeur les mécanismes physiopathologiques.



Figure 15 : Simulation informatique de la formation d'hexamère de spastine (Eckert et al. 2013).

L'hexamère peut incorporer un ou plusieurs monomères différents (hélices jaune et rouge) selon plusieurs choix de conformations (I). L'assemblage de monomères (II) peut se faire un par un (A), ou par fusions successives de dimères (B) ou de trimères (C).

A la base de tout événement de clivage, se forme un complexe comprenant un hexamère de spastine et une molécule d'ADP. L'échange d'ADP par un ATP augmente considérablement l'affinité de fixation de la spastine pour les microtubules (Wen et al. 2013). En retour, l'interaction avec les microtubules favorise l'hydrolyse de l'ATP ainsi que le recrutement d'ADP. Le complexe hexamère-ADP nouvellement reformé diminue l'affinité d'adhésion aux microtubules et entraîne le détachement de la spastine. De ce fait, dans le cycle de la spastine (Figure 16 ci-dessous), le recrutement d'ATP par l'hexamère de spastine conduirait à une fixation sélective et éphémère au niveau des microtubules, rapidement suivi par une hydrolyse de l'ATP et un détachement de la protéine. C'est lorsque l'hexamère se détache des MTs que chaque partie va se désolidariser des autres pour retourner à l'état de

monomère (non représenté sur la Figure 16 ci-après). Un autre cycle minoritaire est proposé dans la Figure 16 : une étape intermédiaire de l'hexamère vide capable de se fixer aux MTs puis de recruter l'ATP. Dans cette modélisation, la fixation de l'hexamère aux MTs contribuerait au recrutement de l'ATP et à l'autostabilisation de l'interaction MTs-hexamère. Celle-ci contribuerait toujours à entraîner l'hydrolyse de l'ATP et le détachement de l'hexamère. Le temps d'interaction pour lequel la spastine va rester accrochée aux microtubules a été estimé à 10 secondes, contre 4 secondes pour la katanine (Eckert et al. 2012). Curieusement, les taux de dissociation et d'association de ces deux protéines sont sensibles à des traitements au NaCl (Eckert et al. 2012) laissant supposer que la fixation aux microtubules requiert une interaction ionique. Une étude cristallographique de la spastine a montré la présence d'un motif électropositif au sein du domaine enzymatique (Taylor et al. 2012), ce qui pourrait être une piste pour comprendre les mécanismes d'interaction de l'hexamère avec les microtubules.



Figure 16 : Cycle de l'hexamère de spastine et de la consommation d'ATP (Wen et al. 2013).

L'hexamère de spastine est représenté par le cercle noir, les microtubules par les traits noirs horizontaux. L'épaisseur du trait des MTs correspond à sa spécificité d'interaction avec l'hexamère. Deux cycles ont été proposés dans cette étude.

Le premier cycle est considéré comme majoritaire dans la cellule. A) La formation de l'hexamère entraîne l'échange ADP/ATP; B) Le complexe hexamère-ATP se lie aux microtubules en raison d'une augmentation de son affinité (trait horizontal noir épais); C) L'hydrolyse de l'ATP entraîne une réduction de la force d'adhésion aux microtubules (traits horizontal gris); D) L'hexamère se détache des microtubules pour revenir à la formation hexamère-ADP initiale.

Un second cycle est proposé comme minoritaire. D) L'hexamère relâche naturellement l'ADP ; E) L'hexamère en état « libre » se fixe aux microtubules et entraîne le recrutement d'un ATP ; B) La formation du complexe hexamère-ATP consolide l'interaction avec les microtubules mais favorise la dégradation de l'ATP ; C) L'hydrolyse détache l'hexamère et permet le retour au complexe hexamère-ADP initial.

# *iii. La fonction de clivage*

Comme nous l'avons vu, l'activité de clivage de la spastine passe par la formation d'un hexamère, l'interaction avec les microtubules, et l'hydrolyse de l'ATP. Encore de nos jours, ce mécanisme basique de la protéine est largement mal compris même si beaucoup d'études proposent des hypothèses fonctionnelles.

Communément, on considère que la spastine passe l'essentiel de son temps sous forme de monomères. Ceux-ci seraient suffisants pour interagir avec des partenaires et activer des voies de signalisation spécifiques.

Toutes les étapes depuis la formation de l'hexamère jusqu'au détachement des microtubules (ce qui force la séparation des six isoformes de spastine) sont considérées comme transitoires. Actuellement inconnus, des signaux cellulaires (partenaires, complexes protéiques, signaux biochimiques etc ...) doivent être responsables du recrutement de plusieurs monomères, de la formation de l'hexamère, et de l'activité finale de clivage d'un MTs sur une zone spécifique sans impacter le réseau de MTs dense aux alentours. Par ces mécanismes spécifiques potentiels, la spastine pourrait réaliser son activité de régulation de la dynamique des MTs de manière sélective et contrôlée.

L'hexamère de spastine se lie aux MTs et insère la queue C-terminal de la tubuline au sein d'une cavité centrale au sein de l'hexamère (White et al. 2007). Lors de l'étape de clivage, la dégradation de la molécule d'ATP entraine un changement de conformation qui piège la queue C-terminale de la tubuline au sein de l'hexamère (Roll-Mecak et al. 2008). L'action d'hydrolyse réduit l'affinité d'accrochage aux MTs, ce qui détache le complexe protéique et applique une force mécanique localisée. Celle-ci est suffisante pour « casser » le protofilament de tubuline. La dépolymérisation d'un seul « tube » suffit à propager un effet de catastrophe aux autres protofilaments composant le MT (Roll-Mecak et al. 2008).

L'activité de clivage de la spastine a été caractérisée *in cellulo* et *in vitro* (Evans et al. 2005). La différence d'effet entre M1 et M87 (voir Figure 17, p.46) démontre l'importance des autres domaines mais aussi l'impact fort que peut avoir une mutation sur une forme de spastine plus qu'une autre. Nombres d'études se sont intéressées à ces différents points clés du rôle physiologique de la spastine, sans réussir à déchiffrer parfaitement les mécanismes impliqués. Couplés à la complexité des PSHs, la frontière permettant d'englober la mutation et ses nombreux impacts restent donc mal déterminés.



Figure 17 : Les spastine sauvages M1 et M85 clivent les MTs.

En haut, la spastine M1 clive en partie les MTs et se localise dans le RE. En bas, la spastine M85 coupe complètement le réseau de MTs et reste concentrée dans le cytosol. Les cellules HeLa ont été transfectées avec les constructions spastine-GFP et marquées avec un anticorps anti-tubuline totale (en rouge). Expérience réalisée au sein de notre laboratoire.

# *iv. Interaction avec des partenaires et impact sur les voies cellulaires*

Dans cette sous-section nous allons passer en revue les partenaires connus avec lesquelles la spastine est capable d'interagir et qui permettent à la protéine de dépasser sa simple fonction de clivage et d'affecter des fonctions cellulaires spécifiques (division cellulaire, tubulation des endosomes, remodelage du RE ...). Les effets de ces interactions sur les phénotypes pathologiques dus aux mutations de la spastine sont largement inconnus à l'heure actuelle.

D'autres protéines impliquées majoritairement dans le cadre des PSHs à transmission autosomique dominante, comme l'atlastine-1 (SPG3A) et REEP-1 (SPG31) ou les réticulons, RTN1 et RTN2 (SPG12), semblent avoir un lien avec la spastine. L'atlastine-1 est une protéine qui joue un rôle crucial dans la formation du réseau du RE, notamment dans la formation de jonction (Hu et al. 2009). Le domaine hydrophobe spécifique à la spastine M1 interagirait avec la paire de domaine hydrophobe présent sur l'atlastine (S. H. Park et al. 2010). Les protéines de la famille des REEP sont impliquées dans le remodelage de la membrane du RE et seraient capable d'interagir avec la spastine et l'atlastine (Connell et al. 2009; S. H. Park et al. 2010). L'interaction complexe entre les domaines hydrophobes de la spastine, de l'atlastine et des REEPs couplerait le remodelage du réticulum endoplasmique à la dynamique des microtubules. À l'aide d'expérience d'immunoprécipitations, il a été proposé que la spastine interagisse avec RTN1 (Mannan, Boehm, et al. 2006), une protéine présente dans la membrane du RE et connue pour jouer un rôle dans le la mise en place du transport vésiculaire. RTN2 serait également un partenaire au niveau de courbure induites par le repliement de la membrane du RE (Montenegro et al. 2012). L'implication de ces partenaires dans le cadre large des PSHs est un argument supplémentaire dans le rôle important de la spastine M1 dans la mise en place du cadre pathologique.

- La protéine CHMP1B entre dans la formation du complexe ESCRT (endosomal sorting complex required for transport) -III impliquée dans l'abscission des cellules filles à la fin de la division cellulaire (Yang et al. 2008; Connell et al. 2009). La spastine M87 interagit directement avec CHMP1B au niveau de ce complexe et permet le « coup de ciseau » final sur les MTs maintenant les deux cellules filles (Reid et al. 2004). IST1, une autre protéine du complexe ESCRT, permettrait le recrutement de la spastine au sein de ce complexe et la médiation de la fission des endosomes aux points de contact entre RE (Allison et al. 2013 ; Allison et al. 2017). L'interaction entre IST1 et la spastine jouerait également un rôle dans le désassemblage du fuseau mitotique et le scellage de l'enveloppe nucléaire (Vietri et al. 2015).
- La délétion de la région requise pour l'interaction entre spastine et NA14, une protéine centrosomal, perturbe la capacité de liaison de la spastine aux microtubules (Errico et al. 2004). NA14 est aussi impliqué dans le développement axonal (Goyal et al. 2014). Prise ensemble, ces observations suggèrent que la protéine NA14 pourrait jouer un rôle d'adaptateur de la spastine, notamment au niveau périnucléaire, et va dans le sens de l'implication de la spastine dans la dégénérescence des axones des neurones moteurs dans le cadre des PSHs.
- Mutée dans le cadre des PSHs-SPG33, les mutants protrudine perdraient leurs capacités d'interaction avec la spastine (Mannan et al. 2006). La protrudine est aussi impliquée dans le trafic endosomal et notamment travaillerais comme adaptateur entre les moteurs moléculaires de la famille KIF5 et leurs cargos (Matsuzaki et al. 2011). L'importance d'une perturbation du trafic endosomal, mécanisme pathologique le plus fréquemment incriminé dans le cadre des PSHs, et l'effet sur

l'extension des neurites (Pantakani et al. 2011) contribuent ensemble à penser que l'interaction spastine-protrudine aurait un lien dans la mise en place de la pathologie.

Toutes ces données complexifient le domaine d'action de la spastine au niveau cellulaire, et suggèrent l'implication de cette protéine dans la régulation d'un large panel de mécanismes cellulaires.

# b. Les mutants pathologiques

De nombreuses études se sont attachées à caractériser différents types de mutants de la spastine ou à prédire de nouveaux sites de mutations (Svenson et al. 2001; Molon et al. 2003; Tang et al. 2004; de Bot et al. 2010; Henson et al. 2012; Fink et al. 2013; Racis et al. 2014; Solowska et al. 2014).

Dans les cas de PSH-SPG4, les patients sont hétérozygotes expriment 50% de protéines fonctionnelles. Plus de 300 mutations ont été répertoriées (The human gene mutations database HGMD, voir Figure 18, p.49), qui touchent dans environ 50% des cas le domaine AAA. L'altération de la fonction de clivage des MTs est donc un facteur important dans la mise en place de la pathologie.

Certaines études (Pantakani et al. 2008; Eckert et al. 2012; Eckert et al. 2013) montrent que l'augmentation croissante de la concentration de mutant induit une diminution spécifique de la capacité de clivage de la spastine sauvage (pour une concentration fixe). Ces résultats reproduisent un cadre pathologique progressif cohérent avec ceux observés dans les PSHs. Cependant, la diversité des cas suppose une plus grande complexité de mécanismes corrélée à une diversité génétique des patients.

Comme il n'est pas possible d'étudier toutes les mutations, notre étude se focalisera sur des constructions portant la mutation pathologique C448Y (C445Y chez la souris) qui touche le motif de Walker B impliqué dans la dégradation de l'ATP (Evans et al. 2005 ; White et al. 2007). La protéine est donc incapable de se détacher des MTs et de les cliver. En complément, et afin de comprendre l'importance du domaine AAA, nous avons utilisé une construction M1 dépourvu de domaine enzymatique.

Cette mutation a été étudiée par d'autres auteurs (Pantakani et al. 2008; Taylor et al. 2012; Solowska et al. 2014) cependant les diversités de localisations ou les différences fonctionnelles entre isoformes de spastine porteuses d'une même mutation ont rarement été étudié.



Figure 18 : Plusieurs types de mutations de la spastine affectent les patients.

Les mutations qui touchent le domaine enzymatique AAA représentent plus de 50% des cas pathologique. Cependant, ces mutants varient selon le type de mutations (missense, splice et nonsens) ce qui explique la complexité des cas de PSHs lié au gène SPG4.

#### i. Haploinsuffisance VS Gain de fonctions neurologiques

Les données de la littérature proposent deux voies pour caractériser l'émergence les PSHs-SPG4.

L'haploinsuffisance. La réduction d'activité de clivage des microtubules, lié à l'inactivation d'un allèle spastine, est devenu l'hypothèse la plus récurrente pour expliquer les cas de PSHs-SPG4 (Hazan et al. 1999; Bürger et al. 2000). Le clivage des microtubules dans les neurones permet la formation des petits segments de microtubules plus facilement transportables dans l'axone (Wang et al. 2002; Baas et al. 2006) et aussi crée un plus grand nombre d'extrémités dynamiques (Roll-Mecak et al. 2006). Les effets observés dans différents modelés neuronaux ou la spastine est mutée ou absente, mais aussi chez les patients, comme la réduction de la croissance axonale, la réduction en nombre des branchements axonaux (Riano et al. 2009; Qiang et al. 2010), une plus grande stabilisation du réseau de microtubules et un impact sur le transport axonal (Kasher et al. 2009; Denton et al. 2014; Havlicek et al. 2014) suggèrent fortement l'idée qu'une réduction d'activité de clivage des microtubules contribue à la mise en place du principal phénomène proposé comme altéré dans le cadre pathologique. De plus, bien que certains mutations de la spastine génèrent des formes stables, la plupart résultent théoriquement en formes tronquée d'au moins le domaine AAA (Depienne et al. 2007; Beetz et al. 2008; Boone et al. 2014). L'ARN messager codant pour ces protéines pourrait alors être pris en charge par des mécanismes de dégradations spécifiques, ce qui empêcherait leur traduction (Lykke-Andersen et al. 2015; Popp et al. 2016). En effet, aucune étude à l'heure actuelle n'a permis de détecter l'expression de ces protéines tronquées, ce qui va dans le sens d'une haploinsuffisance.

> Le gain de fonction pathologique. Il pose en hypothèse la capacité de la protéine mutée à développer une nouvelle fonction toxique pour la cellule ou qui affecterait négativement l'activité de clivage de la spastine sauvage. En effet, la traduction de certains ARN messagers porteurs de mutations faux sens de la cassette AAA résulterait en l'expression de protéines mutées inactives aussi stable que leurs homologues sauvage (Solowska et al. 2010). Certains de ces mutants incapable de cliver les microtubules ont montrés une capacité particulière à décorer les MTs et à former des fagots (Errico et al.2002; McDermott et al. 2003; Evans et al. 2005; Roll-Mecak et al. 2005; White et al. 2007; Pantakani et al. 2008; Eckert, et al. 2013; Solowska et al. 2014). Ces observations suggèrent une capacité de ces mutants à affecter la dynamique des microtubules et des fonctions qui lui sont associées, comme le transport axonal (Solowska et al. 2008; Solowska et al. 2014; Leo et al. 2017). Ces mutants pourraient même « parasiter » la fonction de clivage de la spastine sauvage par la formation d'hétérohexamères inactifs et donc réduire ultérieurement la capacité de clivage de la spastine non mutée. Cependant, de nos jours, aucunes corrélations n'ont été observées entre ce type des mutations et les différents phénotypes pathologiques répertoriés chez les patients. Enfin, les protéines mutées n'ont pas été identifiées chez les patients ou dans les modèles pathologiques, laissant ouverte la discussion sur ce développement de capacité.

# ii. Modèles développés

Face à la grande complexité du problème scientifique posé, un large panel de modèles ont été développés et sont présents dans la littérature.

Des lignées de cellules souches olfactives ont été développées à partir de cellules de patients PSHs (Abrahamsen et al. 2013). Ces cellules, portant différentes mutations, montrent une dysrégulation de plusieurs gènes codant par exemple pour la stathmine ou pour des kinésines. La stathmine est une protéine capable de se lier aux dimères de tubuline et de réguler négativement la formation des microtubules. Au niveau protéique, la spastine est réduite de 50% alors que la stathmine est augmentée de 150%. Ces perturbations entraînent une réduction spécifique du ratio de tubuline acétylée, sans modification du ratio de tubuline tyrosinée. Les cellules sont également plus petites. Plusieurs modèles neuronaux ont aussi été développés pour se rapprocher des conditions physiologiques et pathologiques :

- Un modèle de drosophile PSHs (Trotta et al. 2004; Sherwood et al. 2004; Orso 2005; Baxter et al. 2014). Via l'usage d'un ARN interférent anti-D-spastine, ce modèle de drosophile a mis en avant un défaut dans la croissance synaptique et une atteinte de la neurotransmission. La D-spastine semble également avoir un lien dans la régulation de la stabilité des microtubules puisqu'une stabilisation anormale du réseau de MTs a été observée dans la partie distale de l'axone. Les larves dépourvues de spastine montrent une altération de la morphologie de leurs neurones moteurs et un plus grand taux de décès lors du passage en stade nymphal. Les spécimens adultes rescapés montrent une altération de la température (18°C contrairement aux 24°C standard) a permis d'augmenter le taux d'éclosion et le temps de vie des individus dépourvus de spastine tout en améliorant le réseau synaptique. Cet impact positif du froid pourrait être un aspect thérapeutique à développer au court de cette thèse.
- Via une séquence d'oligonucléotide antisens tourné contre le codon d'initiation, le modèle d'embryons de poissons zèbre est dépourvu de spastine (Wood et al. 2006; Butler et al. 2010). Les auteurs ont montré que la réduction de spastine contribuait à des troubles importants dans la formation du réseau de neurites, dans la régulation de la dynamique des MTs et dans le maintien de la motilité du cône de croissance.
- > Des modèles de souris dépourvus de spastine ont été mis en place par plusieurs équipes. La délétion d'une partie du gène (Exon 5-7) conduit à la formation prématurée d'un codon STOP (Tarrade et al. 2006). Les animaux montrent une dégénérescence axonal progressive, restreinte au niveau du système nerveux central, et qui débouche sur un défaut moteur tardif. L'apparition de gonflements axonaux et l'accumulation d'organelles caractérise ce modèle et le fait entrer dans le cadre des PSHs liés à la spastine. Les auteurs ont également montrés une accumulation des mitochondries et d'autres organelles au niveau de ces gonflements. Un deuxième modèle de neurones de souris (Kasher et al. 2009) a été développé en mimant une mutation sur un site d'épissage connu dans le cadre des PSHs, conduisant à la perte de la protéine. L'apparition de troubles de l'équilibre combiné à la présence de gonflements axonaux et d'accumulation de protéines a permis de rattacher ce modèle au cadre pathologique défini pour les SPG4. L'analyse du transport axonal antérograde a démontré une réduction du mouvement des mitochondries et des vésicules contenant de l'APP (amyloid precursor protein). De plus, les transports antérograde et rétrograde sont fortement diminués dans les neurones ayant formé des gonflements axonaux. Bien que ces deux premiers modèles se basent sur le principe d'haploinsuffisance et de réduction de production de la spastine, un modèle

murin a été développé dans lequel la spastine porte une mutation ponctuelle au niveau de la cassette AAATPase (Connell et al. 2016). Cette mutation (N384K) affecte un résidu au niveau du motif de Walker A, une boucle nécessaire à la liaison de l'ATP, ce qui empêche la protéine de cliver les MTs. Les souris homozygotes âgées de 4 mois ou d'1 an montrent un plus grand nombre de défauts moteurs (longueur et durée de la foulée, natation) et une apparition des gonflements axonaux. Cependant, aucuns effets n'ont été observés chez les souris hétérozygotes.

- A partir des cellules d'un patient SPG4, une équipe a générée un modèle de neurones glutamatergique télencéphalique (Denton et al. 2014). Ils ont observé une forte présence des gonflements axonaux coïncidant avec une accumulation de cargos positifs aux mitochondries et à Tau. Ce modèle laisse supposer qu'un mécanisme d'haploinsuffisance est responsable du phénotype pathologique. En effet, l'apparition de gonflements axonaux a été ici lié à la réduction du niveau de spastine dans le modèle de neurones dérivés de cellules souches de patients (cadre hétérozygote) mais aussi à l'absence de cette protéine dans un modèle de neurones dérivés de cellules souches dépourvus de spastine. Les niveaux d'acétylation sont significativement élevés dans les neurones SPG4.
- Enfin, un modèle de cellules souches dérivées de fibroblastes de patients PSHs a permis de produire des neurones positifs à un marqueur cortical ainsi que des cellules gliales porteuses de mutations de la spastine (Havlicek et al. 2014). La spastine M1 semble n'être exprimée que dans les neurones et les progéniteurs neuronaux, tandis que la forme M87 est plus largement produite. La mutation du gène SPG4 atteint notamment l'intégrité cellulaire des neurones mais aussi le transport axonal rétrograde.

Les différentes altérations de la dynamique des microtubules ou du trafic membranaire, obtenues sur les différents modèles existants, sont récapitulés dans le Tableau 3 (p.53). Bien que peu de résultats similaires ressortent de ces études, des points de similitudes sont à souligner comme la perturbation de la dynamique des MTs, la hausse de stabilité du réseau de MTs au niveau de la partie distale de l'axone, l'apparition de gonflements axonaux dans les modèles mammifères, et l'atteinte du transport axonal.

Modèle cellulaire et spastine	Tubuline acétylée	Dynamique des MTs (EB3)	Trafic Membranaire	Gonflements axonaux	Référence
Neurones issus d'iPS humaines (p.R562X)	Pas de variations	-	Augmentation du % antérograde	Fort mais non quantifé	(Havlicek et al. 2014)
Neurones issus d'iPS humaines (c.683-1G>T)	Augmentation	-	Réduction du % rétrograde	1 par 100 μm	(Denton et al. 2014)
Neurones de souris (ΔExon5- 7)	_	Réduction du nombre	Perturbé dans le renflement axonal	4%	(Fassier et al. 2013; Tarrade et al. 2006)
Neurones de Rat (SiRNA)	-	Réduction du nombre	-	-	(Qiang et al. 2010)
Neurones de souris (ΔExon7)	-	-	Réduction du % antérograde	Faible, non quantifié	(Kasher et al. 2009)
Zebrafish (Spast KO)	-	Réduction du nombre	-	-	(Wood et al. 2006; Butler et al. 2010)
Drosophile (Dspastin)	Augmentation	-	-	-	(Orso et al 2005)

Tableau 3 : Récapitulatif des données présentes dans la littérature sur l'effet de la réduction de clivage par la spastine sur la dynamique axonal.

Bien que ces observations soient complexes à remettre dans le même contexte, elles tendent à conclure que la réduction ou l'absence de spastine perturbent l'homéostasie du transport axonal ainsi que la dynamique des MTs. Pris ensemble, ces deux paramètres pourraient être en lien avec l'apparition de gonflements axonaux observés dans ces différents modèles.

# *iii. Les gonflements axonaux : une piste de thérapie et un lien avec d'autres maladies neurodégénératives.*

La dilatation des extrémités axonales est l'un des principaux phénotypes considérés dans ce type de pathologie. Similaire à des observations post-mortem (Fink et al. 2013), plusieurs des modèles neuronaux (Sherwood et al. 2004; Orso et al 2005; Tarrade et al. 2006; Fassier et al. 2013; Havlicek et al. 2014; Denton et al. 2014) démontrent que la présence ou la réduction d'activité de la spastine suffit à induire ce phénomène (voir Figure 19, p.54).

À travers des travaux portant sur les drogues ciblant les MTs (Tarrade et al. 2006; Fassier et al. 2013), il semble possible de réduire ou d'inhiber la formation de dilatations axonales sur des modèles de souris. Nous ne connaissons cependant aucun des mécanismes qui soustendent ce type d'effet. Ces molécules (notamment le Taxol et le Nocodazole qui sont fortement utilisées en cancérologie) représentent une piste d'intérêt pour le développement d'applications à visée préventive ou curative, deux aspects qui manquent cruellement de nos jours pour les personnes frappées de ces affections.

Le lien avec d'autres neuropathologies est encore mal défini. Une grande part de pathologies neurodégénératives présentent également des formes complexes impliquant d'autres atteintes cérébrales. De plus, le transport axonal et la dynamique des microtubules pourraient être important dans la mise en place des mécanismes de dégénérescence axonale voire neuronale. Certaines pistes sont intéressantes à étudier, comme l'augmentation de la polyglutamylation dans certains cas d'Alzheimer (Zempel et al. 2015) et le lien entre cette MPTs et l'augmentation d'activité de la spastine (Lacroix et al. 2010; Moutin et al. 2011; Valenstein et al. 2016). Mais les liens entre ces maladies restent complexes à établir sans plus d'éléments expérimentaux.

Cependant, le phénotype pathologique de gonflements axonaux a été également observé dans d'autres maladies neurodégénératives comme la maladie de Parkinson, d'Alzheimer ou des formes de sclérose latérale (Millecamps et al. 2013). Bien que souvent liés à une perturbation du transport axonal (Martin et al. 1999; Stokin et al. 2005) et à l'accumulation d'organelles et de vésicules, les mécanismes impliqués dans l'apparition de ces dilatations sont largement inconnus. Nos travaux ont permis de visualiser les transports axonaux de composés spécifiques comme les mitochondries ou VAMP7, un composant critique pour le développement axonal. Le but est de voir s'ils sont atteints dans nos différentes conditions expérimentales.



Figure 19 : La réduction d'activité de la spastine entraîne la formation de dilatations axonales (Tarrade et al. 2006). Culture de neurones corticaux témoins (A, C et C') ou dépourvus de spastine (SPG4-KO, B, D et D'). L'absence de protéine montre une augmentation du nombre de gonflement axonaux.

# c. Objectif de la Thèse

À travers cette introduction, nous avons vus la complexité des PSHs. Nous avons également pu appréhender l'importance de cette protéine pour la régulation de la dynamique des MTs (par clivage), pour le transport axonal de composés, pour l'homéostasie des MPTs, pour l'entretien du RE, pour l'abscission etc ... Il apparaît ainsi que les connaissances relatives aux fonctions des formes sauvages de cette protéine ainsi que des liens entre mutations et pathologies sont encore à compléter. En raison de la complexité du sujet, j'ai focalisé mes travaux de thèse sur une série définie de questions dont la compréhension pourrait éclairer l'ensemble de la thématique. Les différents points que j'ai développés concernent :

- L'opposition entre le principe d'haploinsuffisance et le gain de fonction de certaines mutations pathologiques
- > L'impact d'une mutation sur la localisation de deux isoformes (M1 et M85)
- > L'effet des mutants ou de l'absence de spastine sur le transport axonal
- L'application de traitements pharmacologiques pour tenter de corriger les phénotypes pathologiques constatés dans différentes conditions expérimentales

Dans un premier temps, nous avons utilisé le modèle de souris développé par l'équipe du Dr Melki mimant une haploinsuffisance (Tarrade et al. 2006; Fassier et al. 2013). Nous avons pu montrer que l'absence de spastine conduit à une perturbation du ratio de tubuline acétylée et du transport axonal de composés spécifiques. Cette sélectivité pourrait balancer négativement le transport, réduisant lentement l'adressage de composés importants pour la survie axonal, et permettre la formation des gonflements axonaux observés dans la littérature. Dans un second temps, notre travail a consisté à étudier les différences entre des spastine sauvages et des formes mutées ou tronquées de différents domaines. Nos travaux ont montré que les mutants perturbent fortement l'acétylation des MTs dans notre lignée HeLa, effet conservé même après 48h. Nous avons aussi mis en avant que la régulation de cette acétylation était possible en modifiant les niveaux d' $\alpha$ TaT ou d'HDAC6, prouvant que la résistance à temps long de l'acétylation des MTs passe par des mécanismes complexes. Nous avons aussi mis en évidence une différence de localisation spécifique entre les deux de spastine (M1 et M85) porteuse d'une même mutation (C445Y). Elles réagissent de plus différemment à certains traitements pharmacologiques ce qui suggère une dynamique de régulation différentes. Nous avons aussi observé que l'expression de constructions mutées peut altérer le transport axonal de vésicules positives à VAMP7.

Dans l'ensemble, les résultats obtenus tendent à valider et à vérifier assez largement certaines hypothèses avancées dans la littérature, tout en y apportant des éclairages. Nos résultats sont en outre cohérents avec le fait que l'haploinsuffisance et le gain de fonction pathologique sont toutes deux possibles pour induire une perturbation du trafic axonal, du ratio de MPTs, et conforme à l'importance de l'isoforme longue dans le cadre pathologique.

# Matériels et méthodes

# I. Techniques de biologie moléculaire et cellulaire

# a. Liste des produits et constructions utilisés

Les constructions utilisées dans cette étude ont été décrites dans différentes publications :

- HDAC-GFP et HDAC déficiente-GFP (HDAC DC-GFP) ont été achetées chez Addgene (Gao et al. 2010; Kawaguchi et al. 2003).
- HDAC-Flag et HDAC DC-Flag développées par Addgene, ont été préalablement décrites dans la littérature (Gao et al. 2010; Kawaguchi et al. 2003).
- αTaT1-GFP, αTaT1 DC-GFP (Shida et al. 2010) ont également été commandées chez Addgene.
- > Lys K40A (Mackeh et al. 2014) mutée est un cadeau du Dr Poüs.
- VAMP7-mRFP et VAMP2-GFP ont été décrites préalablement (Burgo et al. 2009; Tsaneva-Atanasova et al. 2009)
- **EB3-GFP** (Fassier et al. 2013).
- Mitom-cherry développée par Addgene (Tanenbaum et al. 2014).

Les constructions spastine produites par notre équipe sont répertoriées ci-dessous dans la Figure 20.



Figure 20 : Représentation schématique des constructions spastine utilisées dans cette étude.

Toutes nos constructions ont un marquage GFP afin de les rendre visible en microscopie par épifluorescence. Les différents domaines présents dans chaque forme de spastine sont représentés en couleur.

Le reste des composés utilisés pour les marquages ou les traitements ont été achetés :

- le Mitotracker orange CM-H2 TMROS a été commandé chez Molecular Probes (invitrogen)
- > le fluorophore Bodipy-FL (Molecular Probes)
- le paclitaxel (Taxol, Sigma-Aldrich)
- Ie Nocodazole (Sigma-Aldrich)
- > la Trichostatine A (TSA, Tocris)
- Ia Tubacine (Sigma-Aldrich)
- > NaCl (FischerScientific)
- Sucrose (Sigma-Aldrich)

Les différents anticorps utilisés au long de cette étude sont listés ci-dessous :

- > Anti-chaîne polyglutamylée, lapin, polyE (Adipogen)
- > Anti-EB1, souris (BD Bioscience)
- > Anti-KIF5B, souris, clone KN-01 (Millopore)
- > Anti-Flag, souris (Sigma-Aldrich)
- > Anti-GAPDH, souris monoclonal (Sigma-Aldrich)
- Anti-katanine, souris, p60 (Santa Cruz)
- Anti-spastine, souris, SPG3/11 (Santa Cruz)
- > Anti-stathmin, lapin polyclonal, est un cadeau d'André Sobel (INSERM, Paris, France)
- > Anti-Tau, mouton, C-17 (Santa Cruz)
- > Anti-tubuline acétylée, souris monoclonal, clone-11B-1 (Sigma)
- > Anti-tubuline β-III, souris, TUJ1 (Covance)
- > Anti-tubuline détyrosinée, lapin polyclonal (Millipore)
- > Anti-tubuline tyrosinée, rat, clone YL 1/2 (Millipore)

Les anticorps secondaires utilisés pour l'immunofluorescence sont couplés à une Alexa Fluor-488, Alexa Fluor-594, Alexa Fluor-643 ou à une CY3 (mouton anti-lapin, anti-souris, anti-rat ou âne anti-mouton) et ont été achetés chez Molecular Probes. Les anticorps secondaires employés pour les Western Blot sont couplés à une IRDye 800CW ou une 680CW (mouton anti-lapin, anti-souris, anti-rat) et ont été commandés chez LI-COR Bioscience.

Les constructions de la spastine N-Terminale, M1 et M85 ont été préparées au sein de notre laboratoire antérieurement à ma venue. Les constructions M1∆-ATPase, M1C445Y et M85CY ont été produites par notre équipe à partir de ces plasmides témoins. Le marquage GFP a été élaboré dans le plasmide pCMV-GFP-N1 (Clontech) et le marquage Flag a été réalisé dans le plasmide pT7-FLAG-MAT-TAG 2 (Sigma). Dans les deux cas, la GFP et le Flag se localisent en C-terminale de la protéine (voir Figure 21 ci-après).



Plasmide pT7-FLAG-Mat-Tag 2 de Thermoscientific



Figure 21 : Séquence des plasmides utilisés pour la réalisation des constructions GFP et Flag.

#### b. Production des protéines

#### i. Insertion de l'ADN dans le plasmide:

Les choix des sites de restriction pour le traitement de l'insert et du plasmide ont été réfléchit pour chaque construction dans le but d'optimiser les insertions des fragments et leurs productions. Les inserts de spastine ont été produits en grande quantité par PCR puis purifiés sur gel. La bande correspondant à l'insert a été isolée et purifiée en utilisant le kit « GeneJet Extraction Kit » (Thermoscientific). L'insert est ensuite digéré 2h à 37°C, grâce à l'usage d'enzymes de restriction spécifiques (Fast digest enzymes, Fermentas) et purifié sur colonne en utilisant le kit « MinElute Reaction Cleanup Kit (50) » (Qiagen) ou « GeneJet PCR Purification Kit » (Thermoscientific). Les plasmides sont ensuite digérés avec les mêmes enzymes de restriction utilisées pour l'insert, puis purifiés avec le kit « GeneJet Extraction Kit » (Thermoscientific) a permis la fusion de l'insert dans le plasmide (voir Figure 22). Toutes ces étapes de production des constructions ont été développées en amont et réalisées en parallèle de ce travail de thèse par Mme Vandana Joshi (ingénieure au sein du laboratoire UMRS 1204).



Figure 22 : Schéma représentant l'insertion d'un fragment ADN au sein d'un plasmide.

Le plasmide donneur comprend la séquence d'ADN d'intérêt (en exemple ici YGOI en jaune). La digestion par des enzymes de restrictions spécifiques (EcoR1 et Not1) permet l'ouverture du plasmide donneur et l'isolation de l'ADN d'intérêt, mais coupe également le plasmide receveur. L'étape de ligation et la similitude des sites de coupes utilisés permettent l'insertion finale dans le plasmide cible.

# ii. Amplification : Maxipréparation d'ADN plasmidique

La transformation bactérienne est une technique couramment utilisée pour produire un gène ou une protéine d'intérêt en utilisant une population de bactéries. L'incubation des bactéries dans un milieu riche en cations, ainsi que le traitement au froid et le choc thermique, affectent la membrane cellulaire pour permettre l'entrée de l'ADN. La présence des cations permet de moduler la charge négative de la membrane bactérienne et d'entraîner l'accrochage de l'ADN, lui aussi chargé négativement. L'incubation dans la glace permet de fragiliser la structure de la membrane, et donc potentialiser l'effet des cations. Le choc thermique force l'entrée de l'ADN au travers de la membrane endommagée.

Dans un premier temps, nous avons réalisé une étape de transformation des bactéries DH5 $\alpha$  (Thermofischer), bactéries de clonage choisies pour leurs capacités à répliquer une grosse quantité d'ADN. Nous avons incubé 0,5  $\mu$ L de plasmide dans 50  $\mu$ L de bactéries, pendant 30 minutes sur glace, puis réaliser un choc thermique 30 secondes à 42°C et 2 minutes sur glace. Après ajout de 250  $\mu$ L de milieu sans antibiotique, les bactéries sont mises sous agitation (225 rpm) à 37°C pendant 1 heure. L'étape d'ensemencement consiste à étaler une petite quantité de bactéries (10 à 20  $\mu$ L) sur une boite de Pétri contenant du LB agar supplémentée de 50  $\mu$ g/mL de kanamycine et de 100  $\mu$ g/mL d'ampicilline, et à l'incuber 16h à 37°C.

En récupérant une colonie isolée dans 5 mL de LB supplémentée de 50  $\mu$ g/mL de kanamycine et de 100  $\mu$ g/mL d'ampicilline, les bactéries sont mises à croître pendant 16h à 37°C. Les cultures sont ensuite centrifugées à 4000 x g à 4°C pendant 10 minutes, et l'ADN est purifié en utilisant le kit de minipréparation « GenJet Plasmid Miniprep Kit » (Thermofischer) et de maxipréparation « Plasmid Maxi Kit (10) » (QUIAGEN). La concentration est quantifiée par spectrométrie UV à 260 nm.

# c. Culture de lignées immortelles : HeLa

Les cellules HeLa (ATCC CCL-2) sont des lignées épithéliales provenant d'un carcinome utérin humain. Ces cellules sont un bon moyen pour étudier facilement et rapidement les propriétés biologiques et mécanistiques des différents mutants de la spastine. Les cellules HeLa ont été cultivées dans un milieu Dulbecco's modified Eagle (DMEM 1X, Thermofisher) supplémenté de 1% de Pénicilline-Streptavidine (100 unités/mL, Invitrogen) et de 10% de Sérum de veau fœtal (SVF, Invitrogen), maintenues dans un incubateur avec 100% d'humidité, 5% CO2 et à 37°C. Les passages sont réalisés régulièrement via un lavage au PBS 1X (GIBCO) et une incubation 5' à 37° dans 1 mL de Trypsine (Tryplex de Thermofischer). La trypsine est une protéase capable de cliver les protéines membranaires d'adhésion et donc d'induire le détachement des cellules. Les cellules sont ensuite redéposées dans un flacon de culture de 75cm2 (50-75 000 cellules) ou utilisées pour les différentes expériences.

# *i.* Protocole de transfection

Pour les protocoles d'immunofluorescences et de vidéomicroscopie, les cellules HeLa ont été déposées sur des lamelles de verres (12 mm et 30 mm) préalablement nettoyées à l'éthanol 100%. Pour les protocoles de Western blot et d'immunoprécipitation, les cellules HeLa sont directement déposées au fond de boîte de Pétri en plastique (60 mm) pour culture cellulaire.

Après préparation des lamelles ou boîtes de cultures, et une fois que les cellules sont au moins à 70% de confluence, les transfections ont été réalisées à l'aide de Lipofectamine 2000 (Life Technologies). C'est un agent de transfection cationique qui permet d'incorporer le plasmide contenant l'ADN au sein de liposomes. Le complexe plasmide-liposome est chargé positivement tandis que la membrane de la cellule est chargée négativement, ce qui entraîne l'endocytose. Une fois ce complexe entré à l'intérieur de la cellule, l'ADN se détache naturellement du liposome, par la suite dégradé par la cellule. Cet ADN est conduit dans le noyau pour y être répliqué et entraîner une surexpression de la protéine d'intérêt.

Expérience	Volume d'opti-MEM total (µl)	ADN (µg)	Lipofectamine (µl)
IF (12 mm)	100	0.5	1
Vidéomicroscopie (30 mm)	500	3	6
WB/IP (60 mm)	500	8	16

Tableau 4 : Exemple de protocoles réactionnels utilisés et ses variations selon les différentes conditions expérimentales

La préparation du mixe ADN-lipofectamine est réalisée dans du milieu Opti-MEM (Invitrogen), complétant l'effet cationique de la lipofectamine. Selon le protocole développé par le fabricant (voir Figure 23, p.62), la première étape est de séparer la lipofectamine et l'ADN chacun dans une moitié de volume final (pour les volumes voir le tableau). Une fois remis en commun, le mixe est laissé à incuber 20 minutes à température ambiante, pour permettre la formation de complexe plasmide-liposome. Après dépôt sur les cellules et 4 heures d'incubation à 37°C, nous avons changé le milieu de culture afin de permettre aux cellules de récupérer pendant 16 heures dans l'incubateur.



Figure 23 : Protocole de transfection des cellules avec la Lipofectamine2000 (Invitrogen).

#### *ii. Immunofluorescence*

Les cellules ont été fixées après ce temps d'attente par incubation 20 minutes dans un tampon de PBS 1X contenant 4% de sucrose et 4% de paraformaldéhyde (PFA). Cette étape de fixation chimique, nécessaire pour une observation en microscopie électronique, permet de bloquer les systèmes enzymatiques et ainsi d'éviter toute modification structurelle des cellules.

Les cellules ont été lavées 3 fois au PBS 1X et perméabilisées 15' à température ambiante dans un tampon de PBS 1X contenant 0.125% de gélatine (Sigma) et 0.1% de Triton X-100 (Thermofischer). Le triton est un détergent non-ionique doux capable de dissocier les interactions lipide-lipide sans affecter les interactions protéine-protéine. Il permet donc de fragiliser la membrane des cellules, permettant l'entrée des anticorps par la suite, tout en solubilisant et isolant les protéines dans leurs formes actives ou natives sans toucher à leurs interactions protéiques.

Les cellules ont été bloquées 30' dans un tampon de PBS 1X contenant 0.25% de gélatine. La gélatine est un agent capable de saturer les sites de fixation aspécifiques, permettant de réduire le bruit de fond obtenu par le marquage immunofluorescent.

L'anticorps primaire a été préparé dans 50  $\mu$ L de tampon de PBS 1X contenant 0.125% de gélatine, et les cellules ont été incubées sur des gouttes d'anticorps sur un parafilm dans un environnement humide pendant 16 heures à 4°C. Après 3 lavages au tampon de PBS 1X contenant 0.125% de gélatine, l'incubation secondaire a été réalisée en suivant la même manière que décrite juste avant, à RT pendant 1 heure. Après 3 nouveaux lavages, les lamelles ont été montées sur lames starfrost (Dûscher) dans 6  $\mu$ L de Mowiol (Sigma). Le Mowiol est un milieu de montage permettant de fixer la lamelle et de préserver une bonne qualité de signal fluorescent.

# iii. Technique de Western Blot

Après élimination du milieu et rinçage au PBS 1X, les cellules ont été détachées et incubées dans un tampon de TSE supplémenté de 5% de triton X-100 et de 0,008 g/mL d'inhibiteur de protéase (Roche), sur glace pendant 30 minutes avec vortex toutes les 5 minutes. Ce tampon permet de perméabiliser les cellules, de conserver les interactions entre protéines tout en fragilisant les interactions avec les lipides. De plus, le produit de chez Roche permet d'inhiber l'activité des protéases et donc de protéger les protéines que l'on souhaite extraire de la dégradation.

Les aliquotes ont ensuite été centrifugés 15 minutes, à 4°C et à 13 000 rotation par minute (rpm). Cette étape permet de ne prélever dans le surnageant les protéines hydrophiles et de concentrer dans le culot le reste des débris cellulaires ainsi que les protéines hydrophobes fortement liées à des lipides.

Le dosage des protéines, par analyse spectrométrique, se base sur la méthode de Bradford. Ce dosage colorimétrique est basé sur le changement d'absorbance du bleu de Coomassie (qui compose le Dye Reagent utilisé dans nos expériences) après interaction avec des acides aminés basiques (dans le cas d'un dosage d'ADN ou d'ARN) et des résidus hydrophobes (dans le cas d'un dosage protéique). La gamme étalon a été préparée à partir de concentration croissante d'albumine de sérum bovin (BSA, Sigma), dans un tampon de Dye Reagent  $1/5^{eme}$  (Bio-Rad), et comparée à des extraits de 3 µL de protéines pour chaque échantillons préparés dans le même tampon de Dye Reagent.

Les gels SDS-page sont préparés à la main avant la préparation des échantillons à déposer. Le principe de la technique de SDS-page est de réaliser une électrophorèse en gel de polyacrylamide afin de séparer les protéines sous l'influence d'un champ électrique. Le pourcentage d'acrylamide contenu dans le gel influe sur la taille des pores (plus il est élevé plus ceux-ci sont petits) et donc la capacité de migration des protéines (plus les pores sont petits plus les protéines sont retenues). Lors d'une électrophorèse, la migration des protéines se fait en fonction de leurs charges électriques mais aussi de leurs tailles. La présence d'un détergent fort comme le SDS dans les différentes solutions dénature les protéines et empêche le repliement de celles-ci tout en leur conférant une charge négative (forçant donc la migration uniquement en fonction de la taille des protéines).

Les gels 12% d'acrylamide préparés pour ces expériences comportent deux phases distinctes : un gel de concentration qui permet une entrée homogène des échantillons dans le second gel et un gel de séparation. Ce dernier a été coulé selon la composition suivante : 2.8 mL de Tris HCL 2M ph 8.8, 150  $\mu$ L de SDS 10%, 6.25 ml d'acrylamide 30%, 5.82 mL d'eau déminéralisé, 80  $\mu$ L d'APS 10%, 10  $\mu$ L de TEMED. Une fois polymérisé, le gel de concentration a été rajouté par-dessus en utilisant : 1.25 mL de Tris HCL 0.5M ph 6.8, 50  $\mu$ l de SDS 10%, 670  $\mu$ L d'acrylamide 30%, 3 mL d'eau déminéralisé, 40  $\mu$ L d'APS 10% et 10  $\mu$ L de TEMED.

À partir de la concentration en protéine calculée par dosage BSA, les mêmes quantités de protéines sont préparées pour chaque échantillon et sont mises à bouillir dans un tampon de TSE contenant 1/5<sup>ème</sup> de volume de colorant d'échantillon (Thermoscientific) supplémenté en dithiothréitol (DTT,). L'ébullition permet de dénaturer les protéines en brisant les liaisons intramoléculaires. Cet effet est accentué par la présence de SDS et de DTT qui empêchent la régénération des ponts disulfures.

Une fois déposés dans chaque puits, les protéines ont été mises à migrer pendant 1h30 à 130 volts. Le transfert sur membrane de nitrocellulose est réalisé à la suite pendant 2 heures à 300 mA, dans la glace. Le montage doit respecter le sens du courant qui définit la direction de migration des protéines (voir Figure 24).



Figure 24 : Représentation du montage pour le transfert des protéines depuis le gel SDS-page sur une membrane de nitrocellulose (abcam).

Les sites aspécifiques ont ensuite été bloqués 1 heure par exposition de la membrane à un tampon de TBS 1X contenant 0.1% de Tween-20 (Sigma) et de 5% de lait écrémé en poudre (régilait). L'anticorps primaire est incubé toute la nuit à 4°C dans un tampon de TBS 1X contenant 0.1% de Tween-20 et de 5% de lait. Après 4 lavages au TBS 1X et 0.1% de Tween-20, la membrane est incubée 2h avec l'anticorps secondaire avant d'être scanné pour révéler le signal fluorescent.

# iv. Extraction d'ARN.

L'extraction d'ARN a été réalisée à partir de cellule HeLa trypsinisées, centrifugées (1000 rpm pendant 5 minutes), et resuspendue dans du PBS 1X. Nous avons lysé mécaniquement les cellules avec une P1000 dans 750 µL de Trizol (Thermofischer) pendant 5 minutes à RT, puis incuber le tout dans 200 µL de chloroforme pendant 3 minutes à RT. Après centrifugation à 12000 rpm, 15 minutes à 4°C, la phase aqueuse transparente est récupérée puis réincubée 10 minutes à température ambiante dans 20 µg de glycogène et 500 µL d'isopropanol. Après une nouvelle centrifugation à 12000 rpm, 10 minutes à 4°C, le culot est lavé avec une solution à froid contenant 75% d'Ethanol. Une dernière centrifugation a permis de récupérer l'ARN sous forme de pellets, de le resuspendre dans une solution « RNAse free water » (Thermofischer) et de vérifier par migration sur gel d'aggarose 1% la qualité de l'extraction.

# II. Expérimentation animale

# a. Modèle animal : souris SPG4 Knock-Out

Le modèle murin C57BL6 utilisé pour ces expériences a été développé et caractérisé par Anne Tarrade et Coralie Fassier (Tarrade et al. 2006; Fassier et al. 2013). Ces souris présentent une absence de production de la protéine spastine, dû à l'ajout d'une séquence aberrante de 1.8 kb nucléotides inactivant l'expression génique. Les souris Wild Type (WT) et Knock Out (KO) pour la spastine sont hébergées et élevées au sein des locaux Genopole du CERFE.

Les génotypages permettant de suivre la génétique des lignées ont été réalisés au sein de notre laboratoire. Des prélèvements de tissus ont été réalisés par le CERFE sur les différentes souris, et lavés deux fois avec de l'eau stérile. Ces tissus ont ensuite été incubés dans un tampon kit KAPA (cliniscience), mit à lysés 15' à 75°C suivit d'une étape d'inactivation des protéases 5' à 95°C. Les extraits ont ensuite été vortexés et centrifugés afin d'éliminer toutes impuretés. La PCR a été réalisé en utilisant un mix capable de révéler à la fois les bandes WT et KO : 12.5  $\mu$ L Kapa 2X, 1  $\mu$ L d'oligo 7F, 2  $\mu$ L d'oligo 7R (commun aux deux gènes), 1  $\mu$ l d'oligo 4F2, 0.35  $\mu$ L de MgCl2, 7.15  $\mu$ L d'eau stérile, 1  $\mu$ g d'ADN. En suivant le protocole de PCR suivant : 10 min à 94°C, puis 32 cycles de 45 secondes à 94°C, 45 secondes à 65°C et 1 minute à 72°C, enfin 10 minutes à 72°C.



Figure 25 : Exemple de génotypage réalisé au laboratoire.

Conformément aux données présentées dans la littérature (Tarrade et al. 2006; Fassier et al. 2013), nos embryons de souris-KO sont dépourvus de spastine et expriment un gène non actif (voir la bande proche des 1000 bp). Les neurones des souris sauvages ou des souris hétérozygote expriment le gène actif codant pour la spastine (visible aux alentours des 500 bp). Sp +/+ = embryon témoin ; Sp  $\Delta/\Delta$  = embryon homozygote ; Sp  $\Delta/+$  = embryon hétérozygote.

#### b. Neurones corticaux

#### *i.* Technique d'extraction des neurones corticaux

Une souris femelle gestante (17 jours) a été sacrifiée par exposition au CO2 dégagé par l'action de l'éthanol sur la carboglace. Après vérification de l'absence de réflexes, l'abdomen de l'animal a été stérilisés à l'éthanol et les embryons ont été dégagés et prélevés. Ils sont ensuite délicatement sortis de leur placenta et numérotés, tandis que leurs queues sont prélevées et déposées dans un tube annoté du même numéro. Ces dernières ont été utilisées pour réaliser un génotypage des individus en parallèle de l'extraction des neurones et selon le même protocole que pour le suivi des lignées génétiques adulte. Les embryons ont été par la suite décapités, leurs cerveaux dégagés et déposés dans un milieu HBSS-Hepes (préparé la veille et conservé à 4°C : 10% d'HBSS 10X, 0.5% d'HEPES 1M, dans de l'eau stérile) sous loupe binoculaire.

Les cerveaux ont été manipulés de sorte à retirer les bulbes olfactifs, les méninges, et à ne prélever que la partie corticale. Les cortex ont ensuite été coupés en fin morceaux sous hotte, et resuspendus dans 3 mL de Trypsine 0.25% dans l'HBSS (Thermofischer) pendant 15 minutes à 37°C au bain marie avec agitation toutes les 5 minutes. Après décantation, le surnageant a été éliminé et les cortex ont été lavés deux fois dans 5 ml d'HBSS 1X pendant 2 minutes, en prenant soin de ne pas léser les tissus. L'individualisation des cortex a été réalisée en ajoutant 300 µL de DNAse 10 mg/mL (Roche) dans 3 mL d'HBSS 1X pendant 5 minutes à température ambiante. Nous avons ensuite dissocié les cellules par une dizaine de pipetage avec une pipette pasteur en verre. Une fois les résultats du génotypage connus, les cellules ont été comptées puis déposées sur des lamelles préalablement traitées à l'acide

(1/3 acide chlorhydrique et 2/3 acide nitrique) et recouvertes avec de la poly-ornithine (Sigma), dans du milieu MEM complet : MEM 31095 (Gibco), 10% final de sérum de cheval, 0,9 g/mL de glucose, 1 mM de Glutamax (Gibco), 1% final de Penicil-Streptavidin). Après 2h à 37°C, le milieu a été remplacé par un nouveau milieu de culture contenant du Neurobasal (Gibco), 2% de sérum B27 (Gibco), et 1 mM de Glutamax (Gibco).

# *ii.* Culture et transfection des neurones

Les neurones embryonnaires sont plus simples à transfecter dû à leur plasticité plus importante comparée aux neurones adultes. Ils ont été maintenus en culture à 37°C sans changement de milieu et transfectés avec la Lipofectamine2000 entre 3 et 5 jours (DIB, day in vitro). Le protocole de transfection des neurones est similaire à celui des HeLa et ne diverge que par la nécessité d'utiliser des quantités plus faible de transfectant et de changer le milieu après 3h de transfection afin de limiter la toxicité. Ce dernier, de même composition (Neurobasal, B27 et Glutamax), doit être incubé 16h dans une culture d'astrocytes de souris. Ces cellules de soutien des neurones, prélevées en parallèle lors des neurones. Bien que le taux de transfection soit faible (5% de neurones), cette méthode permet d'obtenir un nombre suffisant de cellules transfectées et qui ont été utilisées dans nos études. Après un temps d'incubation de 16 à 20h, les neurones ont été utilisés pour les expériences de vidéo microscopie ou fixés pour étudier la localisation de la spastine et de ces mutants par immunofluorescence.

# III. Différences entre les types cellulaires

Le but de cette thèse est de comprendre les mécanismes pathologiques impliqués dans le cadre de paraplégie spastique héréditaire lors de mutation de la protéine Spastine. Ce groupe de pathologies touche spécifiquement les neurones corticaux moteurs et notamment leurs axones. La formation de renflements axonaux, l'un des marqueurs pathologiques rapportés pour ce type de pathologie, laisse penser à une perturbation du transport axonal. Nous souhaitons étudier l'impact que peut avoir la surexpression de constructions de la spastine sur différentes voies cellulaires ou biochimiques. Nous avons donc développés différentes constructions actives ou non. Le modèle de souris KO développé au sein de notre laboratoire est un formidable outil d'investigation permettant de se rapprocher d'un cadre pathologique. Malheureusement, le taux de transfection ne permet pas d'étudier rapidement tous nos points clés. Les cellules HeLa ont permis, de par leur facilité de transfection et leur résistance, de tester un plus grand éventail de protocoles.

#### IV. Microscopie à fluorescence

La technique de microscopie à épifluorescence est une technique de microscopie optique tirant profit du marquage fluorescent. Muni d'un objectif et d'un oculaire, le dispositif grossis l'image d'un objet (le type d'objectif caractérise son grossissement) et sépare les détails de l'image (selon le pouvoir de résolution). L'illumination d'une molécule fluorescente couplée à un anticorps permet une détection plus fine et détaillée mais aussi de séparer différents signaux en fonction des fluorophores utilisés. La limite majeure de cette technique est la faible résolution (submicronique) qui ne permet pas de voir les interactions entre protéines, contrairement à d'autres techniques d'imagerie.

Nos constructions possédant un groupement GFP, nous n'avons pas besoin d'utiliser d'anticorps pour les révéler. Le signal vert nous permet de visualiser spécifiquement la localisation de la protéine hexogène et le marquage de tubuline nous a permit d'étudier la capacité de clivage.



**Préparation cellulaire** 

Figure 26 : Schéma d'un microscope à épifluorescence (collège national des enseignants et praticiens de génétique médicale).

#### V. Vidéomicroscopie

Les vidéos présentées dans ce rapport de thèse ont été prises en utilisant le même microscope à épifluorescence (Nikon, Eclipse Ti-E). Ce Nikon est un modèle de microscope inversé (illuminé par le dessus) équipé d'un objectif Nikon 60X à immersion à huile, d'une source d'illumination Nikon C-HGFI, d'une chambre 1.6X (permettant le grossissement d'images), et d'une caméra digitale Neo-sCMOS (ANDOR). Contrairement à l'immunofluorescence, la prise d'images successives permet de visualiser certains effets biologiques du vivant comme le transport de vésicules le long de l'axone.

Les cellules HeLa et les neurones ont été préparés spécialement pour la réalisation de ces films. Déposés sur lamelles de 30 mm, ils ont été transfectés en suivant le protocole décrit ci-dessus mais n'ont pas été bloqués à la PFA. Après 16 à 24h, les lamelles de neurones ont été montées dans un milieu Krebs-Ringer-Hepes modifié et permettant l'observation : 135 mM NaCl, 2,5 mM de KCl, 1,2 mM de MgCl, 2 mM de CaCl, 20 mM d'HEPES 11,1 mM de glucose, le tout à pH 7,4. La température est contrôlée par injection d'air chaud (37°C). La puissance de la source d'exposition a été réglée au plus bas pour réduire la phototoxicité.

Après avoir isolé un neurone d'intérêt, nous avons lancé la prise d'image sur un unique canal (correspondant au signal des vésicules en mouvements) avec un intervalle de temps défini. Pour les signaux des v-SNARE ou des EB, une image a été prise toutes les secondes pendant 3 minutes contrairement aux films avec mitotracker (une image chaque 5 secondes pendant 5 minutes). Pour l'étude de l'impact de l'expression de la spastine mutée sur le transport axonal, nous avons corrélé un film de VAMP7 avec une image de la localisation de la construction GFP (dont la localisation ne varie pas).

Enfin, les films pour montrer la formation des fagots de M85CY sur les HeLa ont été réalisés avec une prise d'image toute les 5 secondes pendant plusieurs heures. Ce type de vidéomicroscopie a nécessité une transfection et une prise d'image le même jour.

#### VI. Mesure des ratios de fluorescence

Les protéines taguées fluorescentes (V-SNARE ou EB) et le marquage induit par Mitotracker ont tous été étudiés sur la région proximale du neurite le plus long (i.e l'axone) pour une longueur moyenne de 100 µm.

Les fluorochromes des anticorps secondaires ont été choisi de sorte à ce que les spectres d'excitation et d'émission de chacun ne se superposent pas. Il est alors possible de lier l'intensité de signal fluorescent au nombre d'anticorps fixés sur l'échantillon et de proposer une quantification d'un signal précis. Cependant, il faut minimiser les variables de fluorescence lors de l'acquisition, en utilisant les mêmes paramètres d'acquisition et en

photographiant le plus rapidement possible les zones avec une faible exposition. Les phénomènes de trop forte exposition réduise le signal de fluorescence visible, notamment dans les neurones en culture où le signal fragile est exposé régulièrement suite à la prise d'image rapide. Nous avons utilisé différents logiciels pour analyser les données d'immunofluorescence et de vidéomicroscopie :

Immunofluorescence, traitement sur le logiciel MetaMorph : les zones d'intérêts ont été définies sur le microscope lors de l'observation. Pour chaque zone, plusieurs images ont été prises correspondantes aux différents canaux de fluorescences (voir Figure 27, ci-dessous). L'étude de ces images passe par le traitement en parallèle de chacun des canaux de fluorescence. Nous avons calibré le lien entre la distance en µm et la valeur en pixels du signal de l'image. Ce ratio évolue selon l'objectif et le microscope utilisé (exemple pour nos travaux : Nikon 60x = 0.11 µm par pixel ; Nikon  $60x15 = 0.07 \ \mu m$  par pixel). Le contour de chaque cellule a été tracé avec l'outil correspondant, et le logiciel a automatiquement extrait la valeur de fluorescence correspondante. Le transfert des zones dessinées d'une image à l'autre permet d'extraire la valeur de fluorescence de chaque canal en conservant des paramètres identiques. Une fois extraite, les données sont regroupées sur une feuille Excel et filtrées selon l'expression (cellules positives, P+) ou non (cellules contrôle, N) de la spastine. Des données permettent également de déterminer le bruit de fond de chaque image. A chaque valeur de cellules P+ ou N, la moyenne du bruit de fond est soustraite et est nommée valeur X. Ces nouvelles valeurs sont ensuite exprimées en pourcentage, en considérant que la moyenne des valeurs N équivaut à 100%. Le valeurs X\*100 calcul appliqué est donc pour chaque valeurs =  $\frac{valeurs X*100}{Moyenne (valeurs de N)}$ . Les données sont enfin rassemblées dans un fichier GraphPad Prism et forment les différentes figures de cette thèse


Figure 27 : Exemple de quantification du signal d'immunofluorescence.

L'image de gauche montre les cellules positives à la spastine M85-GFP, celle de droite le signal de la tubuline totale. La quantification nous permet d'isoler les valeurs des cellules positives (en vert), des cellules non positives (en rouge), ou du bruit de fond (en blanc).

- Etude du signal immunofluorescent des MTs dans les neurones : le logiciel Metamorph nous a permis de faire un ratio de l'intensité de fluorescence de la tubuline acétylée en fonction des autres MPTs. Après avoir soustrait le bruit de fond, l'intensité de la tubuline a été mesurée depuis le corps cellulaire jusqu'au cône de croissance. Le nombre d'axones analysés varie de 40 à 140 selon les conditions expérimentales. Les données ont été normalisées en fonction des neurones contrôles non traités cultivés dans les mêmes expériences. Chaque expérience a été testée au moins 3 fois.
- Etude du transport axonal : la vitesse et la direction des signaux v-SNARE, des mitochondries et des EB ont été quantifiés par kymographe en utilisant le logiciel Metamorph. Les films de vidéomicroscopie ont d'abord été calibrés sur MetaMorph de la même manière que décrites précédemment. Une ligne a été tracée le long de l'axone et a été utilisée pour réaliser un kymographe (voir Figure 28, p.72). Le Kymographe est une représentation de chaque point de fluorescence (ici une vésicule de VAMP7) en fonction du temps. Le logiciel mesure la position de chaque vésicule par image et représente cela sous forme de ligne. Chaque dessin est donc un composé détecté par le logiciel. L'inclinaison de la représentation définit sa vitesse (distance en fonction du temps) et le sens du transport (antérograde ou rétrograde).

 $\triangleright$ 

Le logiciel nous a donc permis de mesurer automatiquement les vitesses de transport des composés et d'extraire ces valeurs. Les données ont été rassemblées dans un fichier GraphPad Prism et exprimées en valeurs moyenne de vitesse ( $\mu$ m/s) ou différenciées selon le pourcentage de vésicules antérogrades ou rétrogrades. La distance de course de chaque objet entre chaque pause a été étudiée (pour tout mouvement supérieur à 5  $\mu$ m). Les données collectées proviennent de 3 à 8 cultures de neurones différentes. Les nombres de neurones analysés (N) et d'objets traqués (n) sont indiqués sur les figures.



Figure 28 : Deux exemples de kymographe utilisés dans cette expérience.

Quantifier le niveau d'expression de la tubuline et de ses modifications posttraductionnelles par Western Blot : nous avons utilisé le plugin Gel Analysis du logiciel ImageJ. Ce logiciel permet de tracer une zone autour de chaque bande de signal, et d'extraire la valeur d'intensité des pixels. Les données sont ensuite exprimées en ratio de tubuline acétylée sur différentes MPTs (polyglutamylation, tyrosination, et détyrosination) ou par rapport à la tubuline totale (β-tubuline).

### Résultats

## I. Partie 1 : L'absence d'activité de la spastine régule le transport de VAMP7 dans des neurones corticaux.

Par son action de clivage des microtubules, la spastine régule leurs dynamiques (Riano et al. 2009) et peut être impliquée dans le contrôle de processus cellulaires associés aux MTs ce qui inclut le transport axonal, le recyclage endosomal et le remodelage du réticulum (Blackstone et al. 2010; Lumb et al. 2012). Dans les neurones dépourvus de SPG4, l'absence de spastine a été corrélée à une réduction du nombre de MTs dynamiques (Fassier et al. 2013) et à une augmentation de l'acétylation de l' $\alpha$ -tubuline (Orso et al. 2005; Denton et al. 2014). Le transport axonal est également affecté, avec une diminution et une perturbation de la motilité de cargos axonaux (comme les mitochondries) mais pas de leurs vitesses (Kasher et al. 2009; Denton et al. 2014; Havlicek et al. 2014). Les renflements axonaux, le principal défaut axonal pathologique observé sur différents modèles (Tarrade et al. 2006; Denton et al. 2014; Havlicek et al. 2014), a été lié à un défaut de la dynamique des microtubules et du transport axonal. Cette hypothèse s'appuie sur l'enrichissement des renflements en différents organelles, en particulier sur la présence de réseaux de MTs désorganisés (Tarrade et al. 2006; Kasher et al. 2009; Fassier et al. 2013), et sur l'effet de drogues ciblant les microtubules (MTA), comme le Taxol ou le Nocodazole. À très faibles concentrations, ces molécules peuvent prévenir/restaurer les renflements axonaux (Fassier et al. 2013; Denton et al. 2014).

Les données publiées jusqu'à ce jour suggèrent que la spastine régule le transport axonal des mitochondries, mais peu de choses sont vraiment connues sur le rôle de cette protéine sur le transport d'autres composés. De plus, la grande taille des mitochondries complexifie leurs prises en charge par des moteurs moléculaires lors du transport axonal. Nous avons donc choisi d'étudier des protéines plus petites, dont le transport serait plus dynamique, comme les v-SNARE VAMP7 et VAMP2. Les protéines v-SNARE et t-SNARE sont capables d'interagir entre elles et permettent la fusion de membranes, régulant ainsi un large panel de fonctions biologiques de la division cellulaire à la transmission synaptique. VAMP7 est une v-SNARE largement impliquée dans différentes fonctions cellulaires (Daste et al. 2015; Wojnacki et al. 2016). Dans les neurones, les vésicules positives à VAMP7 ont été localisées dans les dendrites et les axones. VAMP7 joue un rôle important dans la formation de l'axone (Gupton et al. 2010), dans la croissance des neurites (Martinez-Arca et al. 2000, 2001; Alberts et al. 2003), dans le guidage axonale (Cotrufo et al. 2011) et pourrait être impliquée dans la libération de neurotransmetteur et les fonctions cérébrales supérieures (Scheuber et al. 2006; Hua et al. 2011; Danglot et al. 2012). Le transport de VAMP7 a été lié au moteur moléculaire Kif5A, dont le gène est altéré dans certains cas de PSHs (Reid et al. 2002; Burgo et al. 2012).

L'objectif de la première partie de mes travaux a été d'éclaircir l'impact d'une réduction d'activité de la spastine sur le transport axonal de différents composants intracellulaires. Le transport axonal, de par son lien avec les renflements axonaux, a été très étudié dans la littérature (voir Tableau 3) principalement sur les mitochondries. Sur notre modèle de souris SPG4-KO, nous nous sommes concentrés sur deux v-SNARE (VAMP7 et VAMP2) ayant des propriétés biophysiques similaires mais des fonctions différentes au sein du neurone et dont le transport est régulé par deux classes distinctes de kinésines.

### a. Le ratio tubuline acétylée/tubuline totale augmente dans les neurones SPG4-KO

Les modifications post-translationnelles de la tubuline sont fortement impliquées dans le transport de composés le long de l'axone des neurones. Notre première analyse a été de vérifier les niveaux d'expression des différentes MPTs dans des axones des neurones corticaux de souris SPG4-KO et de souris WT. En particulier nous avons analysé l'acétylation, la tyrosination, la détyrosination et la polyglutamylation. Les neurones ont été maintenus en culture 7 jours et les niveaux de MPTs ont été analysés par western blot. Comme cela apparait en Figure 29 (voir p.75), nous avons observé une augmentation faible mais significative du niveau d'acétylation de la tubuline dans les neurones SPG4-KO comparé aux niveau mesuré dans les neurones témoins. À l'inverse, les niveaux de tubulines totales, de tubulines tyrosinées ou de tubulines détyrosinées ne sont pas affectés par l'absence de la spastine. Le ratio tubuline acétylée/ $\beta$ -tubuline est accru de 22,4±2,3% dans les neurones SPG4-KO comparé aux neurones WT. Le ratio de tubuline acétylée/tyrosinée est augmenté de 20,1±3,2% dans les neurones dépourvus de spastine.



Figure 29 : Les neurones dépourvus de spastine montrent une augmentation spécifique du ratio tubuline acétylée/tubuline totale.

Ce ratio est spécifiquement augmenté dans les neurones SPG4-KO ( $\Delta/\Delta$ ). Il n'y a pas d'impact de l'absence de la spastine sur la tyrosination ou sur la détyrosination. Les données ont été exprimées en moyenne ± SEM. La significativité a été déterminé par un test de la variance à un facteur, test de Dunnett. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.005, \*\*\*\*p<0.001. ns, non significatif.

Afin d'évaluer et de quantifier le degré d'acétylation des neurones SPG4-KO, nous avons traités des neurones témoins avec différentes concentrations d'inhibiteur de désacétylase (TSA). Ce traitement est connu pour augmenter les niveaux d'acétylation de la tubuline dans différents modèles cellulaires y compris les neurones (Dompierre et al. 2007), modèle dans lequel l'acétylation est finement régulée. Même à la plus faible concentration (100 nM), le niveau d'acétylation est plus élevé dans les neurones traités avec la TSA comparé au niveau

visible dans les neurones SPG4-KO (voir Figure 30 ci-dessous). Le niveau d'acétylation induit par une délétion de la spastine est donc modéré comparé à ce type de traitement TSA. Les ratios de tubuline acétylée/ $\beta$ -tubuline et de tubuline acétylée/tyrosinée sont accrus respectivement de 39,4±6,9% (100 nM de TSA), 38±1,4% (500 nM de TSA) et de 42,3±7,2% (100 nM TSA), 50,7±13,7% (500 nM de TSA).



Figure 30 : L'acétylation de la tubuline observé dans des neurones SPKG4-KO est plus faible qu'une acétylation induite par un traitement à la TSA.

Le traitement à la TSA entraîne une inhibition de l'ensemble des enzymes HDAC de la cellule. Le niveau d'acétylation induit par ce traitement est plus élevé que celui lié à l'absence de spastine, laissant supposer un niveau intermédiaire d'acétylation. Les données ont été exprimées en moyenne ± SEM. La significativité a été déterminé par un test de la variance à un facteur, test de Dunnett. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.005, \*\*\*\*p<0.001. ns, non significatif.

Afin de confirmer les résultats obtenus par Western Blot, nous avons réalisé des expériences d'immunofluorescences et quantifié les ratios de MPTs. De façon similaire, l'acétylation est spécifiquement augmentée comparée aux autres MPTs qui ne montrent pas de changements significatifs (voir Figure 31, p.77).



Figure 31 : Conformément à nos résultats obtenus en Western Blot, l'absence d'expression de la spastine augmente l'acétylation (échelle = 20 μm).

La hausse du niveau d'acétylation dans l'axone et la reproductibilité par la TSA sont similaires à ce qui a pu être observé par Western Blot précédemment. Les ratios de tubuline acétylée/tyrosinée et acétylée/détyrosinée ne sont également pas affectés. Les données ont été exprimées en moyenne ± SEM. La significativité a été déterminé par un test de la variance à un facteur, test de Dunnett. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.005, \*\*\*\*p<0.001. ns, non significatif.

L'absence d'expression de spastine n'a pas d'effet sur l'expression de protéine comme la stathmine ou la p60 katanine, alors que leurs niveaux sont altérés dans d'autres modèles cellulaires (Abrahamsen et al. 2013; Havlicek et al. 2014). De même, l'haploinsuffisance de spastine n'affecte pas le niveau basal de moteur moléculaire du Kif5B ou de la  $\beta$ -tubuline, deux protéines impliquées dans la régulation de la dynamique des microtubules (voir Figure 32).

Ces premiers résultats démontrent une perturbation de la régulation de l'acétylation de la tubuline qui peut être liée à une augmentation de la stabilité du réseau de microtubules dans l'axone des neurones SPG4-KO.



Figure 32 : L'absence de production de la Spastine ne semble pas influencer le niveau d'expression d'autres protéines impliquées dans la dynamique des microtubules.

Sp+/+ = Embryon témoin ; Sp +/ $\Delta$  = Embryon hétérozygote ; Sp  $\Delta/\Delta$  = Embryon homozygote.

#### b. L'absence de spastine a une influence variable sur le transport de VAMP7, VAMP2 et des mitochondries

L'augmentation d'acétylation de la tubuline- $\alpha$  a été rapportée comme facteur positif pour le recrutement et la mobilité de moteurs moléculaires de type kinésine ou dynéine (Dompierre et al. 2007; Reed et al. 2006).

Nous avons étudié le transport de 2 protéines v-SNAREs, VAMP7 et VAMP2, prises en charge par deux familles distinctes de kinésines :

- Kif5A, qui appartient à la famille des kinesine-1, transporte VAMP7 (Burgo et al. 2012)
- **Kif1A**, de la famille des kinesine-3, prend en charge VAMP2 (Liu et al. 2012)

Nous avons également étudié le transport des mitochondries, dont la vitesse n'est pas affectée dans les autres modèles cellulaires mais où le ratio transport antérograde/rétrograde varie (voir Tableau 3). Nous avons ainsi suivi par vidéomicroscopie la dynamique de transport de VAMP7 et de VAMP2, marqués respectivement par des étiquettes RFP ou GFP, et analysé les vitesses par kymographe (voir Matériels et Méthodes).

#### Vésicules positives à VAMP7



#### Vésicules positives à VAMP2



Figure 33 : Suivi de la dynamique de vésicules positives à VAMP2 ou VAMP7 par analyse de kymographes (échelle = 20 μm).

Les vidéomicroscopies pratiquées sur des neurones en culture nous permettent d'identifier l'axone et d'y tracer un kymographe sur le logiciel MetaMorph afin de quantifier les différentes vitesses des vésicules.

La quantification de la vitesse des vésicules positives à VAMP7 dans les neurones SPG4-KO nous a permis de mettre en évidence une augmentation spécifique de la vitesse antérograde Figure 34a (voir p.81). Le traitement TSA augmente de manière similaire l'acétylation et la vitesse de transport antérograde de VAMP7 dans les neurones témoins et les neurones SPG4-KO, comparés aux neurones témoins non traités. Cependant, ce traitement augmente la vitesse du transport rétrograde de VAMP7 dans les neurones WT et SPG4-KO. Nous avons également quantifié la distance de course moyenne parcourue par chaque vésicule (distance parcourue entre deux pauses). Les variations de cette distance reflètent nos observations sur la vitesse (Figure 34b, ci-après) : une augmentation spécifique de la valeur antérograde dans les neurones SPG4-KO, et une hausse conjointe avec le traitement TSA. Ni la réduction de

production de spastine, ni le traitement TSA, n'influent sur la direction de transport des vésicules. Les ratios de transport antérograde et rétrograde ne varient pas de manière significative (voir Figure 34c).



Figure 34 : L'absence de spastine augmente le transport antérograde des vésicules VAMP7 par le biais de l'augmentation de l'acétylation.

Vitesse moyenne du transport antérograde ou rétrograde des neurones contrôles ou dépourvus de spastine (A). Le transport antérograde est sélectivement augmenté par l'absence de spastine dans les neurones SPG4-KO. L'acétylation par la TSA reproduit cette augmentation du transport antérograde (montrant le lien entre acétylation et transport) mais augmente également le transport rétrograde. Distance moyenne parcourue par chaque vésicule (B). L'acétylation induite par le KO-spastine ou le traitement TSA augmente la distance de course des vésicules et donc réduit les temps de pauses. Rapport du nombre de vésicules positives à VAMP7 transportées en direction antérograde ou rétrograde (C). Les données ont été exprimées en moyenne ± SEM. La significativité a été déterminé par un test de la variance à un facteur, test de Dunnett. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.005, ns, non significatif.

De façon opposée, la vitesse de transport antérograde et rétrograde de VAMP2 n'est pas augmentée dans les neurones SPG4-KO comparés aux neurones témoins. Le traitement TSA n'augmente que le transport rétrograde (voir Figure 35a). De plus, ni ce traitement ni l'absence de spastine ne modifient la proportion de vésicules positives à VAMP2 transportées dans un sens ou dans l'autre (voir Figure 35b).



Figure 35 : Le transport de VAMP2 n'est pas affecté par l'acétylation induite par l'absence de spastine.

Moyenne de vitesse du transport antérograde et rétrograde de VAMP2 des neurones témoins et SPG4-KO (A). L'acétylation n'a aucun effet sur la vitesse de transport de VAMP2. Pourcentage de vésicules activement transportées en antérograde ou en rétrograde (B). L'acétylation n'entraîne aucune variation sur la direction de transport des vésicules. Les données ont été exprimées en moyenne ± SEM. La significativité a été déterminé par un test de la variance à un facteur, test de Dunnett. \*p<0.05. ns, non significatif.

Les mitochondries sont mises en évidence par exposition au Mitotracker. Le transport des mitochondries, organelles de taille importante, est plus complexe pour la cellule. Pour cette expérience, nous n'avons donc analysé que les mitochondries dont le mouvement était clair (voir Figure 36a, p.83). La vitesse moyenne de transport des mitochondries n'est pas affectée par l'absence de spastine (voir Figure 36b et c) ni par le traitement TSA. En effet, il

n'y a aucune différence significative entre le transport antérograde ou rétrograde des neurones SPG4-KO comparé aux valeurs obtenues dans les neurones témoins. Nous n'avons pas observé de modifications significatives du pourcentage de mitochondries activement transportées dans les deux directions (voir Figure 36d). Plusieurs études préliminaires avaient montrées une perturbation de cette composante du transport des mitochondries (Havlicek et al. 2014; Denton et al. 2014; Kasher et al. 2009), avec des résultats parfois contradictoires. Nous avons cependant relevé une variation du ratio antérograde/rétrograde, malheureusement nos résultats ne permettent pas d'obtenir une valeur significative permettant de trancher clairement sur ce point.



Figure 36 : La déplétion de spastine n'a pas d'effet sur le transport des mitochondries le long des axones (échelle = 20 µm).

Image de vidéomicroscopie et exemple de kymographe utilisé pour la quantification (A). Quantification de la vitesse de transport antérograde (B) et rétrograde (C) des mitochondries dans les neurones témoins et SPG4-KO. Ni le traitement TSA ni la réduction de la spastine ne modifient la vitesse de transport des mitochondries. La proportion des mitochondries transportées dans le sens antérograde ou rétrograde n'est pas affectée dans notre modèle neuronale (D). Les données ont été exprimées en moyenne ± SEM. La significativité a été déterminé par un test de la variance à un facteur, test de Dunnett. ns, non significatif.

Nos données montrent que la réduction d'expression de la spastine a un effet spécifique sur le transport antérograde de vésicules positives à VAMP7. Aucun effet n'a été constaté sur le transport des vésicules positives à VAMP2 ou sur celui des mitochondries. Cet effet sur le transport antérograde peut être mimé par un traitement TSA. L'augmentation importante de l'acétylation par ce biais accrois également le transport rétrograde de VAMP7 tout comme celui de VAMP2.

# c. Effets des drogues ciblant les MTs (MTA) sur l'homéostasie neuronale et sur le transport axonal

Le principal phénotype pathologique étudié est l'apparition de renflements axonaux (Denton et al. 2014; Tarrade et al. 2006; Havlicek et al. 2014), attribué à une perturbation du transport axonal (Fassier et al. 2013 ; Griffin et al. 1977). Des agents pharmacologiques ciblant les microtubules (MTA), comme le Taxol et le Nocodazole, sont capables de réduire la fréquence de ces renflements sur le modèle murins que nous avons utilisé (Fassier et al. 2013). Nous avons évalué l'effet de ces drogues sur les variations de transport de VAMP7. Les doses de MTA utilisées ici correspondent aux concentrations qui réduisent les renflements axonaux (Fassier et al. 2013).

Des études sur neurones isolés ont montré que les MTA induisent des changements morphologiques ou des variations du niveau des MPTs (Hammond et al. 2010; Witte et al. 2008). Notre première expérience a démontrée, en accord avec les données de la littérature, que le traitement des neurones avec 10 nM de Taxol ou 100 nM de Nocodazole réduisait le nombre d'extrémité positive à EB1 dans les neurones sauvages et SPG4-KO (voir Figure 37a, p.85). Nos analyses d'EB3-GFP par vidéomicroscopie montrent cette même réduction de la dynamique des MTs par le Taxol (voir Figure 37b, p.85), également visible avec la réduction du temps de vie du signal EB3 (voir Figure 37c). Nos quantifications de la vitesse des comètes EB3 ne révèlent pas de différences de polymérisation des MTs dans les neurones témoins ou SPG4-KO (voir Figure 37d, p.85).



Figure 37 : Etude de la dynamique des MTs (échelle = 20 µm).

Les traitements par le Taxol et ou le Nocodazole réduisent le signal EB1 marquant les extrémités positives des MTs (A). Le Taxol réduit également le signal EB3 (B), un autre marqueur des extrémités positives. Quantification du temps de vie des comètes EB3 (C). En cohérence avec son effet, le Taxol réduit le temps de vie du signal GFP. La vitesse de croissance des microtubules (vitesse des comètes EB3) n'est pas affectée par l'absence de spastine ou par le Taxol (D).

Au niveau morphologique, les neurones traités au Taxol présentent des neurites plus longs avec une arborescence plus faible. Au contraire, les neurones traités avec le Nocodazole développent seulement 1 ou 2 extrémités avec une forte réduction des neurites mineurs (Witte et al. 2008) associé à une désorganisation importante du réseau de MTs. Ces effets sur la morphologie neuronale sont « doses-dépendant », comme cela est visible sur les Figure 38 et 39 (p.86 et p.87).



Figure 38 : L'effet du Taxol sur la morphologie des neurones et la distribution des MPTs est « dose-dépendant ».

Des neurones témoins ont été traités ou non avec 1 nM, 10 nM et 100 nM pendant 14h à 16h, fixés et marqués par des anticorps anti-tubuline acétylée ou tyrosinée (échelle = 20 µm).



Figure 39 : L'effet du Nocodazole sur la morphologie des neurones et la distribution des MPTs est « dose-dépendant ».

Des neurones témoins ont été traités ou non avec 10 nM, 100 nM et 1 µM pendant 14h à 16h, fixés et marqués par des anticorps anti-tubuline acétylée ou tyrosinée (échelle = 20 µm).

Comme attendu, les traitements Taxol et Nocodazole perturbent fortement les niveaux de MPTs le long de l'axone. Bien qu'agissant par des mécanismes moléculaires différents, ils contribuent tous deux à l'augmentation du ratio tubuline acétylée/tyrosinée via la réduction du niveau de tubuline tyrosinée (voir Figure 40, p.88). Cependant, l'augmentation du ratio tubuline acétylée/tyrosinée est bien plus importante avec le Taxol. Dans l'ensemble, ces

résultats montrent que ces drogues ont des effets similaires au niveau de la morphologique, de la dynamique des MTs et des MPTs dans les neurones témoins et SPG4-KO.



Figure 40 : Les traitements Taxol et Nocodazole perturbent l'équilibre des MPTs dans l'axone.

Immunofluorescence du signal de tubuline acétylée et tyrosinée dans les axones des neurones témoins (A) et SPG4-KO (B). Le Taxol augmente l'acétylation et réduit la tyrosination de la tubuline. Le Nocodazole réduit plus fortement le niveau de tyrosination que celui d'acétylation, contribuant à l'augmentation du ratio. Quantification du ratio de tubuline acétylée/tyrosinée (C) des images d'immunofluorescence. Expérience de Western Blot confirmant nos résultats obtenus en immunofluorescence (D). Quantification des ratios de tubuline acétylée/tyrosinée (E) ou de tubuline acétylée/ $\beta$ -tubuline (F). Les données ont été exprimées en moyenne ± SEM. La significativité a été déterminé par un test de la variance à un facteur, test de Dunnett. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*\*p<0.001. ns, non significatif.

Comme dit ci-dessus, nous avons étudié l'impact de ces drogues sur le transport axonal de VAMP7 (voir Figure 41, p.90). Le Taxol augmente le transport antérograde de manière similaire dans les neurones témoins et dépourvus de spastine. Il augmente également le transport rétrograde de VAMP7 dans les deux types de neurones. Le traitement Taxol ne corrige donc pas l'augmentation de vitesse induite par l'absence de spastine, mais pousse cet effet en augmentant le transport rétrograde, de la même manière que le traitement TSA induirait les deux types d'augmentations. Le Taxol a un effet sur la vitesse moyenne parcourue par les vésicules, en augmentant le transport rétrograde que dans les deux types de neurones mais ne réduit sélectivement le transport antérograde que dans les neurones SPG4-KO. Nos données n'ont montré aucunes différences significatives de vitesse de transport de VAMP7 ou de vitesse moyenne parcourue par les vésicules, en augmente le transport antérograde que dans les neurones se de transport de VAMP7 ou de vitesse moyenne parcourue par les vésicules. Aucune perturbation du ratio du nombre de vésicules antérograde/rétrograde n'a été observée avec ces agents.



Figure 41 : Le Taxol ne compense pas l'augmentation de vitesse de transport de VAMP7 induite par l'absence de spastine.

Le Taxol augmente le transport antérograde (A) et rétrograde (B) mais ne corrige pas l'effet de l'absence de spastine. Le Taxol réduit la distance moyenne parcouru en antérograde dans les neurones SPG4-KO (D) mais n'a pas d'effet sur le transport rétrograde (D). La proportion des vésicules en antérograde et rétrograde n'est pas affectée par les traitements (E). Les données ont été exprimées en moyenne ± SEM. La significativité a été déterminé par un test de la variance à un facteur, test de Dunnett. \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.005, \*\*\*\*p<0.001. ns, non significatif.

Nos expériences montrent, conjointement avec les données présentes dans la littérature, que les traitements Taxol et Nocodazole influent tous deux sur la dynamique des microtubules, sur la morphologie neuronale et sur le niveau des MPTs par des mécanismes différents. Cependant, aucunes différences significatives entre les neurones témoins et les neurones SPG4-KO traités n'a été mises en avant pour expliquer la correction des renflements axonaux observés sur ce modèle de souris.

#### II. Partie 2 : Des mécanismes de régulation affectent différemment les mutants faux sens de la spastine et suffisent à l'apparition de phénotypes pathologiques.

Les PSHs liés à une altération du gène SPG4 sont des maladies monogéniques majoritairement dominantes. Les patients produisent ainsi 50% de protéines mutées et 50% de protéines actives, ce qui conduit à une réduction des événements de clivage des MTs. L'autre scénario proposé pour expliquer l'apparition de phénotype pathologique est le gain de fonction « pathologique » lié à la présence de la protéine mutée. Des études ont montré que l'expression de certains mutants spastine s'accompagnerait de la formation de fagots de MTs (Erricoet al. 2002; Orso et al. 2005; Solowska et al. 2010; Solowska et al. 2014). A l'heure actuelle, il est difficile d'opter pour l'un ou l'autre de ces deux scénarios ou de mettre en avant des voies moléculaires particulières qui seraient impliquées dans l'apparition de phénotypes pathologiques. Le but de la seconde partie de mes travaux a ainsi été :

- D'étudier la différence de localisation cellulaire entre des constructions de protéines sauvages et mutées.
- De mimer la surexpression de mutants spastine pour étudier un effet potentiel de gain de fonctions pathologique.
- De comprendre les mécanismes moléculaires régulant la dynamique de localisation de spastine porteuse d'une même mutation

# a. Importance des domaines N-Terminal et AAA-ATPase dans la localisation de la protéine spastine et de ses mutants.

Les domaines de la spastine sont impliqués dans la localisation de la protéine au sein de la cellule (Blackstone et al. 2010). Nous avons utilisé ici différentes constructions de spastine marquées par la GFP (voir Figure 42, p.92). Cette procédure nous as permis de suivre facilement le signal de chaque protéines. Les constructions que nous avons utilisé ont été conçues pour mettre en évidence l'importance des domaines de la spastine et plus particulièrement les domaines N-Terminal et AAA-ATPase.

- Construction N-Ter: Elle nous a permis de montrer l'importance du domaine hydrophobe dans la localisation de la spastine M1, conformément aux données existantes (Blackstone et al. 2010).
- Constructions sauvages. Les isoformes de spastine M1 et M85 sont capables de cliver les microtubules et comportent toutes deux les mêmes domaines décris plus haut (MIT, MTBD, AAA). La protéine M85 est cependant dépourvue du domaine N-Terminal hydrophobe.

- Spastine déplétée de la cassette AAA. Afin d'évaluer l'importance de la cassette AAA, et en adéquations avec certaines mutations STOP contribuant à la perte de ce domaine, nous avons recréé deux constructions *delta AAA*. Seuls les travaux sur M1Δ vous seront présentés ici. La localisation de M85Δ est quelque peu confuse, puisque cette spastine est retrouvée dans le noyau des cellules. Dans cette étude nous n'avons pas approfondis les raisons de cette localisation.
- Mutations ponctuels faux sens. Nous avons choisi de travailler sur une mutation connue chez les patients SPG4 (Bürger et al. 2000; Solowska et al. 2014; Errico et al. 2002; White et al. 2007). Le remplacement d'une cystéine par une tyrosine en position 448, au sein du motif de Walker B dans la cassette AAA, empêche l'hydrolyse de l'ATP et maintiens la spastine sur les MTs (White et al. 2007). Afin de voir si des mécanismes de régulation différents impactent les constructions M1-C445Y (notée M1CY) et M85-C445Y (notée M85CY). Plusieurs travaux se sont intéressés à d'autres mutations faux sens de la cassette AAA avec un comportement similaire aux mutations utilisées ici (Errico et al. 2002; McDermott et al. 2003; Roll-Mecak et al. 2005; White et al. 2007). Ces données forment la base de connaissances qui nous ont aidées dans ce travail de thèse.



Figure 42 : Schéma des constructions spastine utilisées dans nos travaux.

En orange la partie N-Terminale (84 acides aminés) contenant le domaine hydrophobe, en jaune la cassette AAA responsable du clivage des MTs, et en vert l'étiquette GFP. Les domaines MIT et MTBD ne sont pas représentés ici mais sont localisés dans la partie commune bleue.

Page 93 sur 144

Les constructions sauvages M1 et M85 clivent toutes deux les MTs. Comme précédemment démontré (Solowska et al. 2008), il semble qu'une différence d'effet existe entre ces deux isoformes, la forme M85 clivant en effet plus fortement que la forme M1 (voir Figure 43, p.94). La différence de localisation observée pourrait expliquer cette différence d'effet. La construction M85 est dépourvue du domaine N-terminal et s'étend largement dans le cytosol. Elle est donc théoriquement libre de former des hexamères et de cliver toutes populations de MTs présente dans la cellule. Au contraire, M1 est localisée principalement en région périnucléaire (voir Figure 44, p.96) et sous forme de vésicules (Errico et al. 2002) ce qui pourrait contribuer à réduire sa capacité à former un hexamère ou à interagir facilement avec les microtubules.

L'absence de domaine AAA ou la présence de mutation C445Y empêchent la dégradation de l'ATP et conduisent à l'absence d'activité de clivage de la spastine. Les formes M1 $\Delta$ , M1CY et M85CY sont donc piégées (McDermott et al. 2003; Svenson et al. 2001; White et al. 2007; Roll-Mecak et al. 2005; Solowska et al. 2014) et participent à la formation des fagots de MTs (voir Figure 43, p.94). Dans nos cellules HeLa, M85CY se localise régulièrement en périphérie cellulaire sur des sous-types de MTs isolés très caractéristiques. La spastine M1CY est très largement périnucléaire et montre un réseau plus complexe de fagots qui tendent à s'affiner et disparaître rapidement en s'éloignant. La forme M1 $\Delta$  diffuse de manière plus homogène sur l'ensemble du réseau cellulaire et forme l'entrelacement de MTs le plus important.





Les cellules HeLa ont été transfectées avec les constructions spastine-GFP, fixées après 16h et incubées avec un anticorps anti  $\beta$ -tubuline. Les spastine sauvages clivent les MTs, bien que M1, du fait de sa séquestration au niveau du RE, montre une activité plus limitée. Les mutants et la forme tronquée M1 $\Delta$  sont incapables de couper les MTs et restent piégés sur les fagots qu'ils ont formé (échelle = 20  $\mu$ m).

Le domaine N-terminal est présent sur M1CY mais pas sur M85CY, ce qui localise la forme longue dans la membrane du RE. Afin de vérifier si ce domaine est suffisant pour expliquer la

différence de localisation des isoformes, nous avons réalisé un marquage calréticuline, spécifique du réseau du RE. Le domaine N-terminal isolé est suffisant pour s'insérer sur l'ensemble du RE d'une cellule sans distinction de localisation (voir Figure 44, p.96). Toutes les constructions M1 sauvage ou mutée ont donc une part de localisation avec le RE, tandis que les constructions dérivées de M85 en sont indépendantes. La différence de localisation observée entre les deux mutants ne peut donc être expliquée simplement avec ce paramètre. La forme M1CY devrait être localisée aussi en périphérie et pas confinée en région périnucléaire. Il faut souligner que M1 $\Delta$  qui n'a pas la cassette AAA est capable de s'étaler plus largement sur l'ensemble de la cellule. Nous ne savons pas à l'heure actuelle si un lien existe entre le domaine N-Terminal et la cassette AAA qui permettrait d'expliquer cette différence.



Figure 44 : Le domaine hydrophobe présent dans la partie N-Terminale force la localisation de la construction au sein de la membrane du RE.

Les cellules HeLa ont été transfectées avec les constructions spastine-GFP, fixées à 16h et incubées avec l'anticorps anticalreticuline (échelle = 20 µm). Le domaine hydrophobe seul (N-Ter) se localise de façon homogène dans la cellule, en suivant le réseau du RE. Les fagots formés par les mutants colocalisent à la fois avec le RE et les MTs, attestant d'un rapprochement des deux structures.

Il a été suggéré précédemment que la construction sauvage M1 se localise sur la membrane extérieure des gouttelettes lipidiques (Papadopoulos et al. 2015). Nos marquages avec le Bodipy ont permis de confirmer cette observation sur M1 (voir Figure 45). Nous n'avons pas étudié plus en détails la nature et la composition de ces gouttelettes, malgré la présence de vésicules plus grandes caractéristiques de celles-ci. Les formes N-Ter, M1 $\Delta$  et M1CY forment aussi ce type de vésicules (voir Figure 43, p.94). Cela laisse supposer que ces gouttelettes se formeraient à partir de la membrane du RE. Le signal ponctiforme pourrait correspondre à des gouttelettes lipidiques précoces en attente d'évolution (Papadopoulos et al. 2015), ce

qui serait une nouvelle piste de mécanismes impliquant spécifiquement des formes dérivées de la spastine M1.



Figure 45 : La protéine sauvage M1, mais pas M85, se localise sur la membrane extérieure des gouttelettes lipidiques. Les cellules HeLa ont été transfectées avec M1-cherry ou M85-cherry et fixées après 16h. Les cellules HeLa ont été transfectées avec les constructions spastine-GFP, fixées à 16h et incubées Bodipy pendant 10 minutes (échelle = 20 μm).

Contrairement à une cellule HeLa qui n'est composée que d'un corps cellulaire, les dynamiques d'échanges, de transport, ou de régulation varient fortement entre les compartiments cellulaires composant le neurone. Au sein de nos cultures de neurones, les constructions spastine semblent conserver la même différence de localisation observée dans les cellules HeLa (voir Figure 46, p.99).

La surexpression des formes sauvages de la spastine (M1 ou M85) est toxique pour les cultures de neurones. Seule M1 a été rarement visualisée dans nos cultures (voir Figure 46, p.99). En cohérence avec nos données sur lignées immortelles, M1 forme des vésicules ponctiformes qui se concentrent au niveau périnucléaire dans le soma. Ces vésicules semblent transportées au sein des neurones jusqu'à l'entrée de l'axone. Nous n'avons pas investigué plus en détail ce point en raison du faible taux de transfection de cette construction. A la différence des cellules HeLa, nous n'avons pas observé la formation de vésicules de types gouttelettes lipidiques.

Les marquages immunofluorescent de neurones corticaux de souris montrent que M1 $\Delta$  est tout autant exprimée dans le soma qu'au niveau proximal des dendrites et au niveau distal dans l'axone, confirmant la localisation plus étalée décrite sur nos HeLa. Le signal de M1CY se concentre au niveau proximal des dendrites et axones, cohérent avec le signal périnucléaire observé dans les HeLa. Il forme de plus des patches qui se répètent tout le long de l'axone et des dendrites mais semblent cependant de plus en plus restreints avec la distance. Enfin, la spastine M85CY forme rarement des fagots dans les neurones. Cette construction a été retrouvée au niveau distal des axones sans toucher les dendrites, supposant des mécanismes d'adressage spécifique.



Figure 46 : Les isoformes de mutants spastine M1 mais pas de M85 décorent les MTs dans les neurones corticaux de souris.

A) Les neurones corticaux à div-4 ont été transfectés avec les constructions spastine-GFP, fixés après 16h et marqués par la tubuline acétylée. La forme M1, toxique pour les neurones, apparaît sous forme de petites vésicules s'écoulant à l'entrée de l'axone et en un signal plus diffus au niveau du soma. La forme M1CY est très concentrée au niveau du soma et forme des patches plus spécifiques lorsque l'on s'éloigne le long de l'axone et des dendrites. Pour la spastine M85CY, le signal débute un peu après l'entrée de l'axone et se concentre fortement le long de celui-ci. Enfin la forme M1 $\Delta$  est fortement présente au niveau des dendrites tout comme elle est adressée sur l'ensemble de l'axone ; B) Les neurones corticaux ont été cotransfectés avec la GFP et une construction M1CY-Flag. La construction M1CY portant un marqueur Flag montre le même type de localisation que ce qui a été observé avec la construction GFP. La cotransfection avec la GFP cytosolique montre le réseau de neurites et permet de visualiser les patches de M1CY. Afin de bien mettre en valeur la différence de localisation observée entre M1CY et M85CY, nous avons réalisé des expériences de cotransfection de nos deux types cellulaires (voir Figure 47 ci-après). Conformément à nos précédentes expériences, nos résultats confirment que ces deux isoformes se localisent dans deux zones cellulaires distinctes.



Figure 47 : M1CY et M85CY décorent différentes sous-unités de MTs différentes dans les cellules HeLa et les neurones corticaux.

Les cellules HeLa et les neurones à div-4 ont été transfectés avec M1CY-Flag et M85CY-GFP, fixé après 16h, et incubé avec l'anticorps anti-Flag. La majorité du signal des constructions M1CY et M85CY ne colocalisent pas dans les cellules HeLa et les neurones corticaux de souris. La forme M85CY se délocalise en périphérie alors que la spastine M1CY reste concentrée en périnucléaire.

En conclusion, nous avons montré que les constructions développées dans notre laboratoire se localisaient sur les MTs de manière similaire aux résultats présents dans la littérature. Nous avons mis en évidence que pour une même mutation C445Y les deux isoformes de spastine se localisent dans deux régions de la cellule et semble décorer des populations de MTs différents ce qui laisse supposer des voies de signalisation et ou de régulation spécifiques.

# b. L'acétylation des MTs ne régule pas la localisation des isoformes porteuses de la mutation C445Y.

La nucléation des MTs est périnucléaire au niveau du centrosome (Yu et al. 1993; Keating et al. 1997; Keating et al. 1999; Piehl et al. 2004). Des études ont montré que des petits fragments de MTs peuvent être détachés du site de formation et transportés activement le long des MTs par des mécanismes dépendants de moteurs moléculaires. Il faut se demander si les fagots formés par M85CY sont transportés de cette manière dans la cellule ou formé directement en périphérie. Nous avons réalisé des transfections de courte durée, avec seulement 4h de repos post-transfection, et observé la formation des fagots de M1CY et M85CY. Dans ces expériences M85CY a un signal cytosolique largement diffus à 0 minutes puis se regroupe rapidement pour décorer des MTs périphérique et former des fagots (voir Figure 48, ci-dessous). Cette observation exclut l'idée que M85CY puisse décorer des MTs formés au niveau du centrosome et transportés activement pour atteindre la périphérie. A ces temps court, nous n'avons pas observé de fagots positifs à M1CY ce qui suggère, au-delà des mécanismes de régulations, des dynamiques de formation de fagots et/ou d'adressage plus long pour cette isoforme.



Figure 48 : La construction M85CY-GFP forme rapidement et sélectivement des fagots de MTs en périphérie de la cellule.

Les cellules HeLa ont été transfectées avec les constructions M85CY-GFP, observées à 37°C après 4h de transfection (échelle = 20  $\mu$ m). Les images ont été prises toutes les 5 minutes pendant 2 heures. Nos vidéos montrent que les fagots positifs à M85CY se forment directement en périphérie cellulaire, excluant une formation périnucléaire et un transport le long des MTs.

L'un des points communs de ces deux constructions M1CY et M85CY est la capacité de clivage et d'accrochage aux MTs (White et al. 2007). Certaines MPTs, comme la polyglutamylation, ont montré un rôle important dans la régulation de l'activité de clivage et de l'accrochage aux MTs (Valenstein et al. 2016; Zempel et al. 2015). Cependant le lien entre clivage et fixation n'est pas encore clairement défini. La localisation de la spastine M1CY suggère une préférence de fixation avec des MTs plus vieux et stabilisés, comme les MTs acétylés très abondants dans la zone périnucléaire. Des études ont montrés que l'acétylation n'avait pas d'effet sur la capacité de clivage de la spastine (Valenstein et al. 2016; Sudo et al. 2010) mais le rôle de l'acétylation dans l'accrochage de la spastine n'est pas clair. Nous avons supposé que l'acétylation pouvait être un marqueur dans la localisation de nos mutants. Dans le but de tester cette hypothèse, nous avons comparé le signal de nos mutants et celui de la tubuline acétylée dans des cellules HeLa (voir Figure 49, p.102). Les résultats montrent une colocalisation forte entre la tubuline acétylée et nos constructions incapables de cliver les MTs. Cependant, certains fagots de MTs décorés par un mutant et situés en périphérie ne colocalisent pas avec le signal de tubuline acétylée. Il n'y a donc pas de lien fort montrant que les mutants colocalisent spécifiquement avec la tubuline acétylée. De plus, nous n'avons pas observé une affinité différente en fonction des constructions.



Figure 49 : Les constructions mutées spastine-GFP colocalisent partiellement avec la tubuline acétylée.

Les cellules HeLa ont été transfectées avec les constructions mutées-GFP, fixées après 16h et marquées avec l'anticorps anti-tubuline acétylée (échelle = 20 µm). Les MTs positives aux mutants colocalisent avec les fibres acétylées principalement au niveau périnucélaire. Les parties zoomées montrent des régions avec des MTs acétylé ou non et positifs à la spastine.

Pour confirmer que l'acétylation ne participe pas à la régulation de la localisation de nos constructions mutées, nous avons augmenté ou diminué les niveaux de cette MPTs. Les traitements pharmacologiques ont permis d'inhiber spécifiquement HDAC6 (avec la Tubacine) ou plus largement de bloquer l'activité de l'ensemble des HDAC (par la Trichostatine A, TSA), augmentant dans les deux cas l'acétylation. Dans les cellules HeLa (voir Figure 50, p.104), les constructions M1CY et M85CY ne sont pas délocalisées. De même, l'expression d'HDAC6 et de lysine mutée non acétylable dans les cellules HeLa et les neurones corticaux n'ont pas montré d'effets significatifs (voir Figure 50 p.104 et Figure 51 p.105). En conclusion, nos expériences suggèrent que l'acétylation des MTs n'est pas impliquée dans la régulation de la fixation des mutants spastine et n'est pas suffisante pour expliquer la différence de localisation que nous avons observée entre nos isoformes M1CY et M85CY.



Figure 50 : L'altération des niveaux de tubuline acétylée ne modifie pas la localisation des constructions mutées de la spastine (échelle = 20 µm).

A) Les cellules HeLa ont été traitées 6h avec la TSA ou la tubacine, fixées et incubées avec l'anticorps anti-tubuline acétylée. Aucune de nos observations n'a permis de visualiser clairement une modification du signal de M1CY ou de M85CY ; B) Les cellules ont été cotransfectées avec les spastines-GFP et des constructions HDAC-Flag active ou non, fixées après 16h et incubées avec l'anticorps anti-Flag. Dans les deux cas, les constructions M1CY et M85CY maintiennent leurs localisations spécifiques.



Figure 51 : La surexpression de lysine non acétylable n'altère pas la localisation des mutants spastine.

A) Les cellules HeLa ont été cotransfectées avec les constructions spastine-GFP et une lysine mutée non acétylable marquées Cherry, puis fixées après 16h. Les trois constructions M1Δ, M1CY et M85CY conservent leurs localisations spécifiques malgré la présence de lysine mutée. B) Les neurones montrent le même type de résultat négatif observé sur les HeLa. Aucun effet sur la localisation des mutants n'a été observé ici (échelle = 20 µm).

# c. Les mutants spastine augmentent significativement le niveau d'acétylation des MTs.

Même si l'acétylation n'est pas responsable de la localisation spécifique des mutants, l'absence de clivage de nos constructions induit un nouvel équilibre de stabilité du réseau de MTs. Ainsi, une réduction du clivage devrait entraîner une augmentation du nombre de MTs « âgés » plus stables et plus acétylées. En effet, nos expériences d'Immunofluorescence et de Western Blot (voir Figure 52, p.107) montrent que la surexpression de mutants (M1CY, M85CY et M1 $\Delta$ ) entraîne une augmentation spécifique de l'intensité de la tubuline acétylée (respectivement de 59,3±4,7%, 100,4±8,3% et 46±5,1%). Cet effet semble être spécifique à cette MPTs car aucunes altérations de la tubuline tyrosinée (voir Figure 53, p.108) ou de la tubuline totale (voir Figure 55, p.111) n'ont été observées. Comme attendu, les formes sauvages réduisent fortement les niveaux des deux MPTs. Aucunes augmentations de la détyrosination ou de la polyglutamylation n'ont été observés en présence de mutants dans nos cellules HeLa, malgré l'usage de plusieurs anticorps. Le niveau basal de ces MPTs est très faibles dans ce type de cellules (Lacroix et al. 2010). Ces résultats sont cohérents avec des données de la littérature qui montraient que des mutants similaires (avec une mutation faux sens dans le domaine AAA) augmentaient le niveau de tubuline détyrosinée dans des cellules COS-7 (Evans et al. 2005).




Figure 52 : La formation de fagots de MTs induit une augmentation de l'acétylation des MTs dans les cellules HeLa.

A) Les cellules HeLa ont été transfectées avec les constructions Spastine-GFP, fixées après 16h et incubées avec l'anticorps anti-tubuline acétylée (échelle = 20  $\mu$ m) ; B) Quantification de l'intensité de signal de la tubuline. Le taux de tubuline acétylée augmente significativement comparé au niveau de tubuline tyrosinée ; C) Le même effet spécifique a été observé par Western Blot. Les protéines ont été extraites après 16h depuis des cellules HeLa transfectées avec des constructions Spastine-GFP. Les données ont été exprimées en moyenne ± SEM. La significativité a été déterminé par un test de la variance à un facteur, test de Dunnett. \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.005, \*\*\*\*p<0.001. ns, non significatif.



Figure 53 : Les mutants spastine n'affectent pas le niveau de tubuline tyrosinée.

Les cellules HeLa ont été transfectées avec les constructions Spastine-GFP, fixées après 16h et incubées avec l'anticorps anti-tubuline tyrosinée (échelle = 20 µm). Contrairement à notre observation avec la tubuline acétylée (voir Figure 52, p.107), le niveau de tubuline tyrosinée n'est pas affecté par la présence de mutants de la spastine.

Après 48 heures de transfection, les deux mutants « colonisent » plus de MTs et forment un réseau plus complexe (voir Figure 54, p.109). Néanmoins les différences de localisation périnucléaire et périphérique sont maintenues. Il est aussi intéressant de noter que l'acétylation de la tubuline est toujours très élevée. Le maintien de l'acétylation à un niveau anormal à long terme et sans compensation cellulaire pourrait amener à un gain de fonction pathologique. Cependant, nous n'avons pas observé d'augmentation du niveau de tubuline acétylée dans nos neurones corticaux positifs pour des mutants spastine. Ceci pourrait être

expliqué par le très haut niveau d'acétylation déjà présent dans les neurones et par différents mécanismes de régulations de cette MPTs.



Figure 54 : Les mutants spastine maintiennent leurs localisations spécifiques et l'augmentation d'acétylation des MTs même après 48h de transfection.

Les cellules HeLa ont été transfectées avec M1CY ou M85CY-GFP, fixées après 48h et marquées avec un anticorps antitubuline acétylée. Les localisations typiques à chaque construction mutée (périnucléaire et périphérique) sont maintenues dans le temps. Les niveaux d'acétylation sont également toujours très élevés, laissant supposer à une absence de compensation.

Deux enzymes sont principalement impliquées dans la régulation de l'acétylation : une acétylase  $\alpha$ TaT, et une désacétylase HDAC6. Nous avons testé l'effet d'un SiRNA contre  $\alpha$ TAT, dont les effets sur l'acétylation sont décrit dans la littérature (Mackeh et al. 2014).

Lorsque l'on compare les cellules traitées avec le SiRNA anti-  $\alpha$ TaT aux cellules témoins, nous observons une réduction significative de l'augmentation d'acétylation de la tubuline induite par l'expression de M1CY ou M85CY (60% et 80% respectivement). Le même effet a été observé en confrontant les cellules traitées avec le SiRNA vide (SiRNA scramble) aux cellules traitées avec le SiRNA anti-  $\alpha$ TaT. Nous n'avons pas observé d'effet sur la tubuline tyrosinée ou la tubuline totale (voir Figure 55, p.111). Nos résultats de Western Blot montrent une réduction de l'acétylation induite par les mutants (de 30% pour M1CY et de 60% pour M85CY) lors d'expression d'HDAC6 active (voir Figure 55, p.111). L'expression d'une forme

inactive démontre que c'est bien l'activité enzymatique d'HDAC6 qui est requise et non la présence de l'enzyme.

Ces résultats démontrent que la surexpression de mutants spastine induit une hausse de l'acétylation de la tubuline qui se maintient à long terme. De plus, la régulation de cette élévation dépendrait de l'activité enzymatique d'enzymes comme  $\alpha$ TaT et HDAC6, qui une fois exprimée sont capables de corriger le phénotype observé.





A) Les cellules HeLa ont été transfectées 24h avec un SiRNA anti-  $\alpha$ TaT ou avec un SiRNA vide (scramble), puis cotransfectées jusqu'à 48h avec le même SiRNA et des constructions de Spastine-GFP mutées (échelle = 20 µm). Les cellules ont été fixées après 72-96h de traitement SiRNA, et marquées avec l'anticorps anti-tubuline acétylée. Le SiRNA d' $\alpha$ TaT diminue l'acétylation induite par l'expression de M1CY ou de M85CY ; B) quantification de l'intensité de fluorescence de la tubuline acétylée. Les données sont normalisées par rapport aux valeurs des cellules non traitées avec le SiRNA et non transfectées (100%) ; C) les quantifications des ratios de tubuline totale ou tyrosinée ne montrent pas de réduction significative ; D) Les cellules HEK ont été cotransfectées ou non (blanc) avec des formes d'HDAC6-GFP active (vert) ou inactive (rouge) et avec des constructions de Spastine-GFP mutées M1CY et M85CY. L'expression d'HDAC6 active (en vert) réduit l'augmentation d'acétylation due à la surexpression de mutants spastine. En rouge l'expression d'HDAC6 inactive n'affecte pas le niveau d'acétylation des MTs ; E) Quantification du panel D du ratio de tubuline acétylée sur la tubuline totale. L'enzyme HDAC6 réduit l'acétylation induite par M1CY d'environ 60% et celle lié à M85CY d'environ 30%. Les données ont été exprimées en moyenne ± SEM. La significativité a été déterminé par un test de la variance à un facteur, test de Dunnett. \*p<0.05, \*\*\*\*p<0.001. ns, non significatif.

## d. Les fagots induits par M1CY sont plus résistants à différentes traitements pharmacologiques.

Notre objectif a été ici d'examiner l'effet de traitements qui déstabilisent le réseau de MTs ou l'homéostasie ionique cellulaire et qui peuvent affecter le comportement biophysique ou la localisation des isoformes M1CY ou M85CY.

Les MTs acétylées et stabilisées sont plus résistantes à la polymérisation et à la dépolymérisation (Baxter et al. 2014; Solowska et al. 2014). Nos résultats ont montré que l'expression de mutant entrainait une hausse des niveaux d'acétylation des MTs. Nous avons d'abord traités nos cellules HeLa transfectées avec un traitement au Nocodazole 6,6 µM pendant 15 minutes à 37°c, un agent connu pour dépolymériser les MTs à ces concentrations (voir Figure 56, p.113). Le marquage de tubuline totale nous as permis de vérifier cette effet cellulaire. Conformément aux données existantes (Solowska et al. 2014), nos résultats montrent qu'une partie des fagots formés par M1CY sont plus résistants à la dépolymérisation induite par le Nocodazole, notamment ceux présent en périnucléaire. Le signal de M85CY devient cytosolique. De plus, la dépolymérisation du réseau de MTs est réduite dans les cellules positives à M1CY comparé aux cellules non transfectées. Le retrait du Nocodazole est suffisant pour permettre la repolymérisation des MTs et le retour complet après 1 heure du signal de M1CY et de M85CY.



Figure 56 : Les MTs positives à la spastine M1CY sont plus résistant à la dépolymérisation induites par le Nocodazole. Les cellules ont été transfectées avec les constructions spastine-GFP, traitées avec le Nocodazole pendant 1h et fixées après 16h (échelle = 20 μm).

Afin de confirmer cette différence de stabilité entre les deux isoformes mutées, nous avons dépolymérisé les MTs par une exposition au froid. Les cellules HeLa n'ont pas de MTs

résistants à ce type de traitement, l'incubation sur glace force donc la destruction du réseau sur l'ensemble de la cellule (Ochoa et al. 2011). Comme observé pour le Nocodazole, les fagots positifs à M1CY, mais pas à M85CY, résistent mieux au traitement au froid (voir Figure 59, p.117). Cependant, ces fagots apparaissent plus ponctiformes et moins conservés qu'avec le traitement Nocodazole. Les fagots formés par M1 $\Delta$  sont également perdus et le signal est localisé dans le RE, suggérant que la protéine s'est simplement détachée des MTs mais reste insérée dans la membrane de cette organelle.

Une étude *in vitro* a montré que les liaisons ioniques participent au mécanisme d'accrochage de la spastine aux MTs. Cette liaison a été déstabilisé en jouant sur la concentration de NaCl (Eckert et al. 2012). Nous avons souhaité vérifier si les mutants conservaient cette même propriété dans les cellules HeLa et si l'on pouvait s'en servir pour décrypter les différences entre chaque isoformes. A ces fins, nous avons traité les cellules avec le NaCl 0,25 M pendant 30 minutes (Mackeh et al. 2014) ou avec du sucrose 0,3 M pendant 2 heures (Stuible et al. 2008 ; Murakami et al. 2000). Nous avons observés dans ces conditions une délocalisation complète de M85CY et M1 $\Delta$  (voir Figure 59, p.117). La localisation de ces deux constructions devient similaire à celles des protéines sauvages : M85CY est cytosolique, et M1 $\Delta$  apparait dans la membrane du RE et sous forme de signaux ponctiformes. Au contraire, les fagots positifs pour M1CY sont résistants à ce traitement et toujours présents au niveau de la région périnucléaire. La résistance de M1CY au NaCl est similaire à ce qui a été observé avec les traitements au Nocodazole et au froid.

Le traitement au froid et la variation de force ionique perturbent toutes deux la localisation des constructions mais les fagots positifs à la forme M1CY restent résistants. Nous avons étudié via la récupération de ces conditions les capacités de chaque spastine à recoloniser le réseau de MTs. La restauration de la température physiologique à 37°C permet aux MTs de repolymériser rapidement en 30 minutes. Les mutants reforment en 90 minutes le même type de fagots qu'observés dans les cellules contrôle (voir Figure 57, p.115). Contrairement aux autres constructions, la résistance de M1CY permet le retour un peu plus rapide du réseau de fagots de MTs de façon similaire à ce qui a été observé en condition basale. Le NaCl modifie l'acétylation des MTs (Mackeh et al. 2014). Après 60 minutes, l'élimination du sel et l'incubation à une température physiologique de 37°C permet le retour de l'acétylation à un niveau basal. Cependant, nos mutants prennent 150 à 180 minutes pour revenir dans des conditions de contrôles initiales (voir Figure 58, p.116). La quantification de l'intensité de fluorescence de la tubuline acétylée (voir Figure 59, p.117) confirme la capacité des mutants à recoloniser les microtubules. La résistance de la spastine M1CY (en vert) est également visible par le biais de nos résultats montrant une plus faible réduction des niveaux de tubuline acétylée.



Figure 57 : Les fagots positifs à M1CY récupèrent plus rapidement après un traitement au froid que ceux positifs à M85CY.

Les cellules HeLa ont été transfectées avec des constructions Spastine-GFP mutées M1CY ou M85CY, traitées 20 minutes sur glace, puis fixées et incubées avec un anticorps anti-tubuline acétylée. Quelques fagots de M1CY mais pas de M85CY ou de M1 $\Delta$  résistent à la dépolymérisation. Dès 30 minutes de récupération, les MTs se reforment et les mutants les réintègrent et reforment des fagots.



Figure 58 : Les fagots positifs à M1CY récupèrent plus rapidement après un traitement au NaCl que ceux positifs à M85CY.

Les cellules HeLa ont été transfectées avec des constructions Spastine-GFP mutées M1CY ou M85CY, traitées 30 minutes avec du NaCl 0.25M, puis fixées et incubées avec un anticorps anti-tubuline acétylée. Le retour à un signal « témoin » a été observé à partir de 180 minutes. Au contraire, le signal de M1CY est plus résistant à ce type de traitement, bien que partiellement délocalisé au niveau du RE. La récupération via la formation de fagot semble également plus rapide puisque le réseau de fagots revient partiellement dès 90 minutes.



Figure 59 : Les fagots positifs à M1CY mais pas à M85CY ou à M1Δ sont résistants aux traitements NaCl et au froid.

Les quantifications du signal de la tubuline acétylée dans les cellules traitées au froid (B) ou au NaCl (C) ont été réalisées sur Metamorph. Nos résultats vont dans le sens d'un effet de résistance de la spastine M1CY contrairement à M85CY. Les données ont été exprimées en moyenne ± SEM. La significativité a été déterminé par un test de la variance à deux facteurs, test de Fisher. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.005, \*\*\*p<0.001. ns, non significatif.

En accord avec les résultats obtenus avec le NaCl, la variation de force ionique due au sucrose délocalise surtout le signal du mutant M85CY mais pas les fagots positifs à M1CY (voir Figure 60, p.118). Nos résultats rejoignent l'hypothèse d'une interaction ionique entre la spastine et les MTs.



Figure 60 : La variation de force ionique induite par le sucrose délocalise fortement M85CY mais pas M1CY.

Les cellules HeLa ont été transfectées avec des constructions Spastine-GFP mutées M1CY ou M85CY, 2 heures avec du Sucrose 400 nM, puis fixées et incubées avec un anticorps anti-tubuline acétylée. Conformément à ce qui été observé avec le NaCl, la spastine M1CY mais pas M85CY est résistante à ce type de traitement.

Ces résultats montrent une plus grande stabilité des fagots de M1CY face à une déstabilisation du réseau de MTs, contrairement à ceux formés en présence de M85CY ou de M1 $\Delta$ . Cette construction est aussi plus résistante à l'inhibition provoquée par une augmentation de la force ionique (traitements NaCl et sucrose). La présence conjointe du domaine N-terminale et de la cassette AAA, nécessaire respectivement pour l'insertion au RE et la formation d'hexamère, semble être une piste raisonnable pour expliquer cette résistance plus importante.

#### e. Formation de l'hexamère pathologique.

Dans les cellules coexprimant les protéines M1 sauvage ou mutée, des structures en filaments caractéristiques ont été observés, remplaçant le signal ponctiforme (Errico et al. 2002; Pantakani et al. 2008). L'un des objectifs de cette thèse est d'étudier cet aspect d'interaction entre isoformes en cotransfectant une spastine sauvage M1-Flag et des constructions mutées-GFP. En cohérence avec les données existantes, nos résultats montrent que M1-Flag forme des filaments et colocalise avec des MTs décorés par l'isoforme M1CY (voir Figure 61, p.119). Ces expériences suggèrent une interaction et/ou un recrutement de ces deux protéines au sein de l'hexamère. À l'heure actuelle, nous n'avons pas observé ce même type d'interaction entre M1 et M85CY ou entre M85 et M85CY. Nos expériences préliminaires de Western Blot (non montrées ici), n'ont pas permis de comprendre si ce type d'interaction entre M1 et M1CY pouvait avoir un effet réducteur sur la capacité de clivage de l'hexamère. Bien que préliminaire, nos résultats supportent l'idée d'un possible gain de fonctions négatifs, notamment pour les formes longues de spastine porteuses d'une mutation faux sens (Solowska e al. 2015).



Figure 61 : Le mutant M1CY seul est capable de recruter la forme sauvage M1.

Les cellules HeLa ont été cotransfectées avec les constructions M1CY-GFP ou M85CYGFP et M1-Flag, fixées après 16h, et incubées avec l'anticorps anti-Flag (échelle = 20 µm). Certaines cellules montrent une réduction de l'activité de clivage de la spastine M1flag et une colocalisation de la forme sauvage avec la spastine mutée M1CY. Aucun recrutement de M1flag n'a été observé sur les fagots positifs à M85CY.

# f. La présence de mutants spastine à un effet fonctionnel néfaste sur le transport axonal.

Le défaut de transport axonal a été largement associé à une réduction d'activité de la spastine (Kasher et al. 2009; Denton et al. 2014; Havlicek et al. 2014; Plaud et al. 2017). Cependant, peu d'études s'intéressent à l'effet des mutants spastine sur le transport axonal rapide. Dans l'axone géant de calamar et dans les cellules SHS5Y, le transport axonal est altéré par une M1 dépourvus de cassette AAA (Soloswka et al. 2017). Dans ces modèles, les mutants M87 n'altèrent pas le transport. Nous avons récemment démontré que le trafic de la v-SNARE VAMP7 était altéré dans des neurones SPG4-KO (Plaud et al. 2017).

Afin d'étudier si la surexpression de spastine mutées M1 régulaient le trafic de VAMP7, nous avons cotransfectés nos neurones corticaux avec cette RFP-VAMP7 et des constructions M1CY ou M1 $\Delta$ . Les vitesses ont été relevées sur des zones positives aux mutants et d'au moins 100 µm de long. Nos résultats montrent que la présence des deux isoformes réduit la vitesse de transport antérograde (0.72±0.04 µm/s, 0.43±0.03 µm/s et 0.53±0.04 µm/s respectivement pour GFP, M1 $\Delta$  et M1CY) mais aussi du mouvement rétrograde (0.71±0.02 µm/s, 0.48±0.02 µm/s et de 0.5±0.03 µm/s respectivement pour GFP, M1 $\Delta$  et M1CY) des vésicules positives à VAMP7 par rapport aux cellules témoins (voir Figure 62, p.121). De plus, le nombre total de vésicules positives en mouvement a été significativement réduit par l'expression de mutants M1, particulièrement par M1 $\Delta$ .

Ces données suggèrent un gain de fonction pathologique des isoformes spastine porteuses d'une mutation faux sens. La capacité d'accrochage aux MTs et la formation de fagots pourrait perturber le transport axonal en modifiant le nombre de « routes » empruntable par les moteurs moléculaires. L'étape suivante serait de voir si un traitement au NaCl, capable de décrocher les constructions mutées, permet une amélioration du trafic de VAMP7. Malheureusement, la toxicité du traitement NaCl pour les neurones corticaux ne nous as pas permis de réaliser ce type d'expérience.





A) Les neurones ont été cotransfectés avec des constructions spastine-GFP M1CY ou M1 $\Delta$  et VAMP7-RFP, montés sur lamelle et observés en vidéomicroscopie (échelle = 20 µm); B) exemple de kymographe réalisé au niveau des zones positives à la spastine; C) L'expression des deux constructions M1CY et de M1 $\Delta$  réduit significativement le transport antérograde et rétrograde des vésicules positives à VAMP7; D) Le nombre de vésicules positives à VAMP7 par µm est également impacté par les mutants M1 et en particulier par M1 $\Delta$ . Les données ont été exprimées en moyenne ± SEM. La significativité a été déterminé par un test de la variance à un facteur, test de Dunnett. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*\*p<0.001. ns, non significatif.

#### **Discussion et conclusions**

### I. Absence d'activité de la spastine : effet sur l'acétylation et sur le transport axonal

Malgré les résultats présents dans la littérature sur l'implication de la spastine dans la régulation de la dynamique des microtubules, son rôle sur le transport axonal est encore très loin d'être établi. Dans le modèle de neurone SPG4-KO utilisé ici, nous avons montré que le niveau d'acétylation est spécifiquement augmenté comparé aux neurones témoins en accord avec des études préliminaires (Orso et al. 2005; Denton et al. 2014). Cet effet semble être restreint à l'acétylation, puisqu'aucune altération n'a été observée sur d'autres MPTs comme la tyrosination, la détyrosination et la polyglutamylation. De plus, aucun changement d'expression n'a été montré sur des protéines impliquées dans la dynamique des microtubules. Les travaux de A.Tarrade suggèrent que les renflements axonaux seraient enrichis en tubuline détyrosinée sans l'avoir montré formellement (Tarrade et al. 2006). Ainsi, une augmentation de l'acétylation de la tubuline pourrait représenter une réponse spécifique à une réduction ou un manque d'activité de la spastine. Théoriquement, une faible concentration de spastine entraîne une augmentation du nombre de microtubules longs qui devraient être un meilleur substrat pour l'activité catalytique lente de l'α-tubuline acétyl-trasnférase ( $\alpha$ TaT). Devant l'importance de la spastine dans des processus neuronaux comme la formation de branchement axonaux, des mécanismes moléculaires pourraient compenser le défaut d'expression de la protéine. L'activité de la katanine, une autre protéine capable de cliver les MTs et fortement exprimée dans le système nerveux central, est régulée par l'état d'acétylation des microtubules. (Solowska et al. 2008; Sudo et al. 2010). Ainsi, l'augmentation du niveau d'acétylation dans les neurones SPG4-KO pourrait augmenter l'activité de clivage de la katanine sans requérir une augmentation de son expression.

Plusieurs études ont montré que les moteurs moléculaires ont une plus grande affinité avec les microtubules stabilisées (Hammond et al. 2010; Reed et al. 2006). Particulièrement, une augmentation des niveaux d'acétylation de l' $\alpha$ -tubuline augmente la motilité et le recrutement des dynéines et des kinésines-1 sur les microtubules (Dompierre et al. 2007) qui est directement en lien avec une augmentation du transport de vésicules au niveau de MTs stabilisés. Des études sur le transport axonal des mitochondries ont démontré que seule la motilité des mitochondries était altérée sans que la vitesse de transport ne soit affectée (Janke et al. 2014; Kasher et al. 2009; Havlicek et al. 2014). Ces données suggèrent qu'une réduction de la spastine n'aurait pas d'effet sur les moteurs moléculaires impliqués dans ce type de transport. Nos données confirment ces hypothèses, puisque la vitesse de transport des mitochondries n'a pas été modifiée dans les neurones dépourvus de spastine que nous avons étudié. De plus, la vitesse de transport antérograde de VAMP7 est significativement

augmentée, suivant l'idée d'un renforcement de l'activité des moteurs moléculaires de type kinésine. Suite à l'effet mentionné au-dessus sur l'effet de l'acétylation sur les moteurs moléculaires, nous pensons que cet effet tardif dépend grandement du niveau d'acétylation de la tubuline observé dans les neurones SPG4-KO. De faibles doses de drogue comme la TSA ou le Taxol qui, par des mécanismes différents, accroissent la proportion de microtubules stables/dynamiques, augmentent aussi le transport antérograde de VAMP7 d'une manière similaire à ce que nous avons observé dans nos neurones sans spastine. Ceci rejoint de nouveau l'idée d'une activité accrue des moteurs moléculaires dans les neurones PSG4-KO ou traités pharmacologiquement. Au contraire, la vitesse de transport des vésicules contenant la protéine VAMP2 n'est pas modifiée dans les neurones dépourvus de spastine ou traités à la TSA, suggérant que seulement le transport de cargos spécifiques est impacté par la réduction de spastine. Une première explication de ces résultats est que VAMP7 et VAMP2 sont largement prises en charge le long des microtubules par deux différentes familles de kinésines, respectivement une kinésine-1 Kif5A et une kinésine-3 Kif1A. De plus, seul les membres de la famille des kinésies-1 ont été associés à une préférence de MPTs, notamment l'acétylation, alors que les kinésines-3 ne montrent pas ce type de sélectivité. Cependant, cette première explication n'est pas suffisante pour expliquer l'absence d'effet sur le transport d'autres cargos régulés par des kinésines-1, comme les mitochondries ou les vésicules APP, sur des neurones dépourvus de spastine (Denton et al. 2014; Kasher et al. 2009; Havlicek et al. 2014). D'autres paramètres comme la taille des cargos, le nombre de moteurs moléculaires engagés, et probablement la présence de protéines adaptatrices seraient des éléments importants formant une seconde explication sur la régulation du transport axonal dans un cadre d'activité de spastine réduite.

Nous avons aussi observé, dans les neurones traités TSA, une hausse de la vitesse de transport rétrograde de VAMP7 et de VAMP2 suggérant une augmentation d'activité des dynéines. Cet effet est corrélable à l'augmentation forte d'acétylation induit par cette drogue comparé à l'acétylation visible dans les neurones SPG4-KO. L'acétylation induite par la TSA a déjà été démontré comme augmentant à la fois la vitesse antérograde et rétrograde du transport de vésicules contenant le BDNF (Dompierre et al. 2007). Dans les cellules les mécanismes par lesquels les moteurs moléculaires sont recrutés et activés par l'acétylation de la tubuline sont largement incompris. Des expériences *in vitro* suggèrent que des mécanismes *in vivo* additionnels dépendant des niveaux d'acétylation, comme le recrutement de MAPs spécifiques ou des changements structurels dans la tubuline, augmentent l'affinité des moteurs moléculaires et leurs motilités. Le scénario le plus probable est que l'importance d'acétylation peut affecter différemment ces ou d'autres paramètres et seul un fort taux d'acétylation accroîtrait significativement l'interaction et l'activité des dynéines et/ou de ses protéines adaptatrices sur les microtubules.

Les renflements axonaux sont un marqueur pathologique largement observés dans plusieurs types de neuropathologie chez l'homme ou chez des vertébrés non humains (Millecamps et

al. 2013; Tarrade et al. 2006; Denton et al. 2014). Ces structures sont souvent causées par une dérégulation du transport axonal rapide et souvent liées à un défaut sévère du transport de cargos axonaux, incluant les vésicules, les protéines de membranes ou les mitochondries. Les MTA sont une piste prometteuse de traitement pour les maladies neurodégénératives et permettent notamment de prévenir ou restaurer les renflements axonaux, même utilisées à faible concentration. Les mécanismes moléculaires impliqués sont cependant largement incompris. Dans cette thèse, nous avons démontré que le Taxol et le Nocodazole ne permettaient pas de corriger la vitesse de transport antérograde de VAMP7 observé en absence de spastine. L'augmentation du niveau d'acétylation par le Taxol, contrairement à l'effet dépolymérisant du Nocodazole, conduit à l'accroissement de la vitesse du transport rétrograde de VAMP7, de façon similaire à ce qui a été observé avec un traitement TSA. Même si un lien direct entre la formation de renflement axonal et la perturbation du trafic axonal n'a pas pu être établit, nos résultats suggèrent que les MTA pourrait corriger ce phénotype pathologique non pas simplement en ramenant les propriétés du trafic à des valeurs basales, mais plutôt, comme le Taxol ou d'autres drogues augmentant l'acétylation de la tubuline, contrebalançant le transport antérograde altéré par l'augmentation de la vitesse de transport rétrograde de cargos spécifique, comme VAMP7 ici.

En conclusion sur cette première partie, nos résultats sont cohérents avec ceux présent dans la littérature et cohérant avec le modèle proposé en Figure 63 (voir p.125). L'absence ou la réduction de la spastine entraîne une hausse du nombre de MTs longs et désorganise localement le réseau de MTs au sein de l'axone. Ces conditions anormales conduisent à l'augmentation du niveau d'acétylation qui a permis, directement ou non, d'augmenter la vitesse antérograde de petits cargos conduis par la kinésine-1 comme les vésicules positives à VAMP7. En conséquence, la dérégulation du transport axonal pourrait induire un défaut axonal comme un renflement local.

Nos résultats ne peuvent pas définitivement conclure si VAMP7 est directement impliqué dans la pathologie lié à un déficit de SPG4. Cependant, une étude récente a montré que la réduction d'expression de la spastine augmente la taille des lysosomes dans différents modèles cellulaires (Allison et al 2017). On sait aussi que VAMP7 est impliquée dans les mécanismes de fusions entre endosomes et lysosomes (Advani et al 1999) mais aussi dans la fusion homotypique entre lysosomes (Ward et al. 2000). Ces résultats pourraient suggérer un lien intéressant entre la modification de la taille des lysosomes dans des cellules dépourvus de spastine et l'altération du transport des vésicules VAMP7 observée chez la souris SPG4-KO. De plus, le fait que les dynamiques de transport de VAMP2 ou des mitochondries ne soient pas affectées dans nos neurones SPG4-KO suggèrent fortement que l'altération lu transport de VAMP7 puisse déclencher et/ou agir sur la progression de la neurodégénération liée à l'absence de spastine. Une régulation fine du transport de VAMP7, dont le rôle est primordial dans le support de l'expansion de la membrane plasmique et le remodelage des neurones lors du développement embryonnaire, est sûrement nécessaire

pour le maintien de la stabilité et de la viabilité des axones longs des neurones du système moteur volontaire.



Figure 63 : Schéma récapitulatif et modèle appuyé par les résultats de nos travaux.

Par sa fonction de clivage, la spastine contrôle la longueur des MTs (Sp +/+). En conditions pathologiques (Sp  $\Delta/\Delta$ ), la réduction du niveau de spastine fonctionnelles conduit à une réduction du nombre d'événements de clivage et à l'élongation des MTs. Cette stabilisation potentielle du réseau coïncide avec une faible hausse de l'acétylation de la tubuline, qui permet d'augmenter la liaison et l'activité des moteurs moléculaires de la famille des kinésines-1. Ceci conduit à l'augmentation du transport antérograde des vésicules positives à VAMP7. De hauts niveaux d'acétylation, induit par exemple par les traitements avec la TSA ou avec le Taxol, activeraient les moteurs moléculaires de types dynéines et entraîneraient une augmentation du transport rétrograde des vésicules positives à VAMP7. La spécificité d'effet des niveaux d'acétylation sur des moteurs moléculaires particuliers permettraient de moduler sélectivement le transport de VAMP7 et non celui de VAMP2.

### II. Gain de fonction pathologique : l'absence de clivage de la spastine perturbe l'homéostasie cellulaire

Même si l'haploinsuffisance reste le mécanisme principal proposé pour expliquer le cadre des PSHs-SPG4, un gain de fonction pathologique a été suggéré depuis quelques années. Les mutations de la spastine M1 sont considérées comme les plus impliquées dans le développement des PSHs de type SPG4. Cette hypothèse se base sur des observations de l'enrichissement de protéine M1 au sein de la moëlle épinière et sur la perturbation du transport axonal en présence de mutants M1 dans l'axone géant de calamar (Joanna M. Solowska et al. 2015). Plusieurs études ont mises en avant que des mutations faux sens des motifs de Walker A et B, situées dans la cassette AAA, génèrent des protéines M1 stables mais inactives qui décorent les MTs. L'hypothèse de gain de fonction négative propose la formation d'un hétéro-hexamère de spastine incluant à la fois des protéines sauvages et mutées, ce qui diminuerait l'activité de clivage et conduire à la pathologie (Eckert et al. 2012; Le et al. 2013). Cependant, la forte expression ubiquitaire, la localisation non restreinte et la forte activité de clivage de la forme courte pose la question de l'implication des mutants de M87 dans le cadre pathologique.

Dans cette étude et en accord avec les données existantes (Svenson et al. 2001; Errico et al. 2002; McDermott et al. 2003; Evans et al. 2005; Roll-Mecak et al. 2005; White et al. 2007; Leo et al. 2017), nous avons confirmé que la spastine M1 arborant la mutation humaine C448Y (C445Y chez la souris) décore une sous-population de MTs périnucléaire dans un modèle de cellule HeLa. Une localisation similaire a été observée sur des neurones corticaux de souris dans lesquels M1CY colonise des MTs situés dans la région proximale de l'axone ou dans les dendrites. Au contraire, la forme courte de la spastine M87 (M85 chez la souris) porteuse de la même mutation se localise sur un ensemble différent de MTs dans les HeLa et reste cytosolique dans les neurones. Ces fagots positifs à M85CY apparaissent plus épais que ceux formés par M1CY et souvent plus regroupé dans des régions périphériques de la cellule. Ces résultats sont partiellement en contraste avec de précédentes observations réalisées sur des fibroblastes RTL-6 et des cellules COS-7 (Errico et al. 2004; Solowska et al. 2014) où les spastine M87 -C448Y et -K388R étaient respectivement cytosolique. Nos résultats sont cependant en accord avec ceux obtenus sur des cellules S2 dans lesquels une D-spastine dépourvue de domaine N-Terminale, porteuse des mutations faux sens, décorent les MTs (Roll-Mecak et al. 2005). Enfin, nos expériences de cotransfections confirment que ces deux mutants spastine M1CY et M85CY se répartissent différemment et ont une localisation spécifique au type cellulaire dans lequel ils sont exprimés. La spastine M1 dépourvue de cassette AAA (M1<sup>Δ</sup>) reste capable de décorer les MTs uniformément distribué sur l'ensemble des cellules HeLa. Encore une fois, c'est en accord avec des données préliminaires (Errico et al. 2002; White et al. 2007) mais en contraste avec les observations sur fibroblastes RTL-6 (Solowska et al. 2014). Dans les neurones, M1<sup>Δ</sup> apparait en long segments axonaux moins discontinu que ceux observés avec la spastine M1CY.

Même si, et cela était attendu, les fagots positifs à M1CY colocalisent avec le RE contrairement à ceux positifs à M85CY, la simple insertion de M1CY dans le RE ne peut suffire à expliquer sa localisation périnucléaire. De plus, le RE est distribué de façon homogène sur l'ensemble des cellules HeLa ou des neurones. Le domaine N-terminal de la spastine mais aussi la forme M1<sup>Δ</sup>, sans cassette AAA, se localise plus largement avec l'ensemble du réseau du RE (voir Figure 44, p.96). Le niveau d'acétylation des MTs, plus élevé en région périnucléaire, n'a pas pu être directement impliqué dans la localisation de M1CY ou de M85CY puisqu'aucuns changements artificiels de cette MPTs n'ont réussi à les modifier (voir Figure 50, p.104 et Figure 51, p.105). Il semble donc que la localisation périnucléaire de M1CY dépende de plusieurs facteurs comme la présence du domaine N-Terminale, du MTBD et de la cassette AAA. La spastine M85CY, essentiellement cytosolique, devrait décorer toutes les MTs sans être restreinte à une simple portion périphérique, ce qui souligne que son interaction avec les MTs doit être régulée par d'autres paramètres que la simple affinité du MTBD (White et al. 2007). Des études complémentaires sont nécessaires pour investiguer en détails ces mécanismes moléculaires et envisager en particulier l'importance des partenaires moléculaires du RE, connus ou non, qui pourraient contribuer à la localisation de la spastine M1CY.

Une hausse des niveaux d'acétylation de la tubuline a été préalablement associée à une réduction d'expression de la spastine dans les neurones (Orso et al. 2005; Denton et al. 2014; Plaud et al. 2017). Dans nos cellules HeLa, toutes les spastine mutées formant des fagots contribuent à stabiliser le réseau et à augmenter l'acétylation des MTs. Nos résultats sont en accord avec de précédentes observations (Evans et al. 2005) et rappellent étroitement l'effet de surexpression d'autres protéines formant des fagots comme MAP2c et Tau (Takemura et al. 1992). La hausse d'acétylation de la tubuline est aussi observée sur des MTs qui ne sont pas décorés par des mutants spastine (voir Figure 52, p.107) suggérant l'activation de voies de signalisation impliquant αTaT et HDAC6 (voir Figure 55, p.111). Cette hausse d'acétylation est conservée même 48h après, supposant une résistance aux mécanismes de compensation. L'acétylation de la tubuline a un rôle important dans de nombreux processus cellulaire incluant le transport axonal. L'impact des mutants sur cette MPTs pourrait donc être important dans la compréhension du processus neurodégénératif. Cependant nous n'avons pas confirmé d'effet similaire sur nos culture de neurones corticaux exprimant M1CY, même avec une très faible dilution d'anticorps anti-tubuline acétylée (1:40000). Cette absence de résultats pourrait être expliquée aux niveaux très élevés de tubuline acétylée dans les neurones ou à des mécanismes de régulation différents dans ces cellules comparées aux cellules endothéliales. La forte densité cellulaire nécessaire pour obtenir un fort taux de transfection et le faible ratio de neurones transfectées nous a empêchés de quantifier l'intensité de fluorescence des MPTs sur une large population neuronale comme réalisé précédemment (Plaud et al. 2017).

Bien que tous les mutants analysés ici soient associés à une augmentation du niveau d'acétylation des MTs, seul les fagots positifs à M1CY ont montrés une résistance aux traitements de dépolymérisation des MTs (Nocodazole et traitement au froid) et de perturbation de l'interaction MTBD-MTs (variation de force ionique avec le NaCl et le sucrose) contrairement à ceux positifs pour M85CY ou M1<sup>Δ</sup>. Pour récapituler ces résultats, l'interaction de la spastine M85CY cytosolique avec une population spécifique de MTs facilite la formation d'oligo-hexamère (Eckert et al. 2012) et permet l'accrochage aux MTs. Au contraire, M1CY et M1A s'étendent au sein de la membrane du RE et interagissent simultanément avec les MTs. Elles peuvent ainsi rapprocher différents tubules du RE et formées des fagots de MTs. Contrairement à M1CY, M1<sup>Δ</sup> ne peut pas former d'hexamère et interagir avec plus d'un MT à la fois. Cette observation suppose que les interactions MTs-RE sont moins complexes en présence de M1A que de M1CY. La présence du RE et la complexité de son interaction avec les MTs au sein des fagots joueraient un rôle dans la différence de stabilité des isoformes de spastine (voir Figure 64, p.129). Ainsi, en absence de MTs ou après perturbation de l'interaction MTBD-Tubuline, M85CY existerait principalement sous formes de monomères cytosolique. L'insertion de M1CY dans la membrane du RE stabiliserait la structure de l'hexamère conduisant à une plus grande résistance de cette forme aux différents traitements. La différence de comportement de M1<sup>Δ</sup> pourrait être liée aux nombres de MTs impliqués et de la complexité des interactions avec le RE. Il a été démontré qu'n traitement au froid sur un modèle de mouche porteuses d'une mutation K388R a montré une amélioration du phénotype embryonnaire et une récupération de la motilité chez l'animal adulte (Baxter et al. 2014). La réduction de la présence de mutants spastine sur les MTs pourrait être suffisante pour relancer une dynamique du transport axonal. Cependant, nos expériences ont montrées que la résistance de M1CY entraine une capacité de récupération plus rapide que celui observé pour M85CY (voir Figure 59, p.117) suggérant que ce type de traitement est inefficace pour une correction à long terme.



Figure 64 : La complexité de l'interaction RE-MTs au sein des fagots positifs aux mutants joue un rôle dans la différence de résistance.

Afin de simplifier le modèle, les hexamères de spastine ont été représentés par le dessin de 3 monomères. Les constructions M1CY et M1Δ contrairement à M85CY (à gauche) sont insérées dans le RE et rapprochent l'organelle des MTs ce qui contribue à l'insérer dans la formation de fagots. Cependant, l'incapacité de M1Δ à former des hexamères entraine la formation d'un fagot à partir d'un unique MTs de façon opposée à M1CY et M85CY qui piègent plusieurs MTs. La résistance aux différents traitements (à droite) de M1CY découlerait la présence du RE et de la complexité de son interaction avec un grand nombre de MTs.

L'effet dominant-négatif des mutants spastine est supposé dépendre de de leurs coassemblage avec des protéines sauvages au sein de l'hexamère (Le et al. 2013) ce qui conduirait à la réduction de l'activité catalytique de l'enzyme (Eckert et al. 2012). Plusieurs études (Errico et al. 2002; Pantakani et al. 2008), incluant nos résultats, démontrent que la spastine sauvage M1 est relocalisé sur des MTs décorés par la protéine M1 mutée. A l'heure actuelle, nous n'avons pas observé la même capacité de recrutement de M1 par M85 mutée, suggérant une plus forte toxicité de la spastine mutée M1 comparé à l'isoforme courte. Des études approfondies sur cette partie sont en cours. A ce jour, il n'est pas clairement établi si la toxicité de ces mutants est liée à une réduction d'activité enzymatique de la spastine sauvage. En effet, des études *in vitro* rapportent que la spastine M1 mutée inhibe à la fois l'activité enzymatique et l'étape de « pre-severing » (l'étape de mise en place de l'hexamère sur les MTs) mais pas la phase de clivage des MTs (Errico et al. 2002).

De plus, les mutants M1 ou M87 ne préviennent pas de l'activité de clivage de la forme sauvage M87 dans les fibroblastes (Solowska et al. 2014). Une hypothèse alternative est que les MTs décorés par des mutants spastine acquièrent des propriétés biophysique « pathologiques », comme un degré différent de stabilisation, qui toucheraient la fonction de transport axonal. Nos résultats montrent que le trafic des vésicules positives à VAMP7 est fortement affecté le long des MTs décorés par M1CY et M1A (voir Figure 62, p.121). Ces données suggèrent que les effets observés ici sont indépendant de l'activité de clivage et en accord avec l'inhibition du transport axonal rapide dans l'axone géant de calamars et dans les neurones corticaux de souris exprimant une protéine M1 dépourvue de domaine AAA (Solowska et al. 2008; Leo et al. 2017). Nous pourrions spéculer que la localisation dans l'axone proximal des mutants spastine, notamment la forme M1CY, puisse réguler l'ensemble du réseau de MTs de cette zone qui correspondent partiellement avec le segment initial axonal (AIS). Dans l'AIS, les MTs sont très rapprochés et assurent une fonction de filtre en formant un rail orienté pour le transport vésiculaire actif. Dans des conditions pathologiques, l'accumulation dans le temps de faibles niveaux de spastine M1 mutée dans l'AIS pourraient altérer le réseau de MTs et sa capacité de régulation du transport axonal amenant à une condition pathologique.

En conclusion, nos données rejoignent l'hypothèse d'un rôle majeur joué par les mutations de M1 dans l'apparition de la pathologie SPG4. Les différences de localisation, de résistance et de capacité d'interaction avec M1 sauvage entre les deux isoformes de spastine porteuses de la mutation CY laissent penser à une plus grande toxicité de la spastine M1 mutée. Notamment, sa localisation proximale dans l'axone et son effet de réduction du transport axonal suggèrent que M1CY serait capable de réguler négativement en amont le transport de composés. Cet effet agirait probablement par une réorganisation du cytosquelette dans cette région et indépendamment de sa fonction de clivage. Cependant, l'hypothèse d'un gain de fonction négative est limitée par la difficulté à observer les mutants chez la plupart des patients PSHs-SPG4. Les chances de validation de cette hypothèse sont donc réduites à l'heure actuelle. De plus, aucun lien n'a été fait entre la variation des aspects cliniques de patients porteurs d'une même mutation et les observations expérimentales obtenues sur ces mutants. Pour expliquer cette différence de sévérité pathologique entre individus une autre hypothèse serait l'existence d'une « cohabitation » entre les effets de l'haploinsuffisance et ceux découlant d'un gain de fonction. Cela rassemble à la fois la réduction possible du clivage et l'accumulation de spastine mutées sur les MTs comme un mécanisme négatif régulant le transport axonal avec une mise en place temporelle. L'investigation de plusieurs mutants faux-sens permettrait de comprendre ces aspects plus en profondeur et serait une nouvelle étape dans le combat contre les PSHs et la classification des différents cas pathologiques.

### **Références bibliographiques**

- Abrahamsen, G., Y. Fan, N. Matigian, G. Wali, B. Bellette, R. Sutharsan, J. Raju, et al. 2013. « A Patient-Derived Stem Cell Model of Hereditary Spastic Paraplegia with SPAST Mutations ». *Disease Models & Mechanisms* 6 (2):489-502. https://doi.org/10.1242/dmm.010884.
- Akhmanova, Anna, et Michel O. Steinmetz. 2008. « Tracking the Ends: A Dynamic Protein Network Controls the Fate of Microtubule Tips ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 9 (4):309-22. https://doi.org/10.1038/nrm2369.
- Alberts, Philipp, Rachel Rudge, Ina Hinners, Aude Muzerelle, Sonia Martinez-Arca, Theano Irinopoulou, Véronique Marthiens, et al. 2003. « Cross talk between tetanus neurotoxininsensitive vesicle-associated membrane protein-mediated transport and L1-mediated adhesion ». *Molecular biology of the cell* 14 (10):4207–4220.
- Alexander, Janice E., Donald F. Hunt, Michael K. Lee, Jeffrey Shabanowitz, Hanspeter Michel, Sunetary C. Berlin, timothy L. Macdonald, Richard J. Sundberg, Lionel I. Rebhun, et Anthony Frankfurter. 1991. « Characterization of posttranslational modifications in neuron-specific class III beta-tubulin by mass spectrometry ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88 (11):4685–4689.
- Allison, Rachel, James R. Edgar, Guy Pearson, Tania Rizo, Timothy Newton, Sven Günther, Fiamma Berner, et al. 2017. « Defects in ER–endosome Contacts Impact Lysosome Function in Hereditary Spastic Paraplegia ». *The Journal of Cell Biology* 216 (5):1337-55. https://doi.org/10.1083/jcb.201609033.
- Allison, Rachel, Jennifer H. Lumb, Coralie Fassier, James W. Connell, Daniel Ten Martin, Matthew N.J. Seaman, Jamilé Hazan, et Evan Reid. 2013. « An ESCRT–spastin Interaction Promotes Fission of Recycling Tubules from the Endosome ». *The Journal of Cell Biology* 202 (3):527-43. https://doi.org/10.1083/jcb.201211045.
- Alper, Joshua D., Franziska Decker, Bernice Agana, et Jonathon Howard. 2014. « The Motility of Axonemal Dynein Is Regulated by the Tubulin Code ». *Biophysical Journal* 107 (12):2872-80. https://doi.org/10.1016/j.bpj.2014.10.061.
- Appert-Rolland, C., M. Ebbinghaus, et L. Santen. 2015. « Intracellular Transport Driven by Cytoskeletal Motors: General Mechanisms and Defects ». *Physics Reports* 593 (septembre):1-59. https://doi.org/10.1016/j.physrep.2015.07.001.
- Audebert, S., E. Desbruyeres, C. Gruszczynski, A. Koulakoff, F. Gros, P. Denoulet, et B. Eddé. 1993.
   « Reversible polyglutamylation of alpha-and beta-tubulin and microtubule dynamics in mouse brain neurons. » *Molecular biology of the cell* 4 (6):615–626.
- Audebert, Stéphane, Annette Koulakoff, Yoheved Berwald-Netter, François Gros, Philippe Denoulet, et Bernard Eddé. 1994. « Developmental regulation of polyglutamylated alpha-and betatubulin in mouse brain neurons ». *Journal of Cell Science* 107 (8):2313–2322.
- Baas, Peter W., Anand N. Rao, Andrew J. Matamoros, et Lanfranco Leo. 2016. « Stability Properties of Neuronal Microtubules: Stability Properties of Neuronal Microtubules ». *Cytoskeleton* 73 (9):442-60. https://doi.org/10.1002/cm.21286.
- Baas, Peter W., C. Vidya Nadar, et Kenneth A. Myers. 2006. « Axonal Transport of Microtubules: The Long and Short of It: Axonal Transport of Microtubules ». *Traffic* 7 (5):490-98. https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2006.00392.x.
- Barra, H. S., J. A. Rodriguez, C. A. Arce, et R. Caputto. 1973. « A SOLUBLE PREPARATION FROM RAT BRAIN THAT INCORPORATES INTO ITS OWN PROTEINS [14C] ARGININE BY A RIBONUCLEASE-SENSITIVE SYSTEM AND [14C] TYROSINE BY A RIBONUCLEASE-INSENSITIVE SYSTEM ». *Journal of neurochemistry* 20 (1):97–108.
- Baxter, S. L., D. E. Allard, C. Crowl, et N. T. Sherwood. 2014. « Cold Temperature Improves Mobility and Survival in Drosophila Models of Autosomal-Dominant Hereditary Spastic Paraplegia (AD-HSP) ». Disease Models & Mechanisms 7 (8):1005-12. https://doi.org/10.1242/dmm.013987.

- Beetz, Christian, Michael Brodhun, Konstantin Moutzouris, Michael Kiehntopf, Alexander Berndt, Dirk Lehnert, Thomas Deufel, Martin Bastmeyer, et Jörg Schickel. 2004. « Identification of Nuclear Localisation Sequences in Spastin (SPG4) Using a Novel Tetra-GFP Reporter System ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 318 (4):1079-84. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.03.195.
- Bieling, Peter, Stefanie Kandels-Lewis, Ivo A. Telley, Juliette van Dijk, Carsten Janke, et Thomas Surrey. 2008. « CLIP-170 Tracks Growing Microtubule Ends by Dynamically Recognizing Composite EB1/Tubulin-Binding Sites ». *The Journal of Cell Biology* 183 (7):1223-33. https://doi.org/10.1083/jcb.200809190.
- Blackstone, Craig, Cahir J. O'Kane, et Evan Reid. 2010. « Hereditary spastic paraplegias: membrane traffic and the motor pathway ». *Nature Reviews Neuroscience*, décembre. https://doi.org/10.1038/nrn2946.
- Bonnet, Crystel, Dominique Boucher, Sylvie Lazereg, Barbara Pedrotti, Khalid Islam, Philippe Denoulet, et Jean Christophe Larcher. 2001. « Differential Binding Regulation of Microtubule-Associated Proteins MAP1A, MAP1B, and MAP2 by Tubulin Polyglutamylation ». *Journal of Biological Chemistry* 276 (16):12839-48. https://doi.org/10.1074/jbc.M011380200.
- Boone, Philip M., Bo Yuan, Ian M. Campbell, Jennifer C. Scull, Marjorie A. Withers, Brett C. Baggett, Christine R. Beck, et al. 2014. « The Alu-Rich Genomic Architecture of SPAST Predisposes to Diverse and Functionally Distinct Disease-Associated CNV Alleles ». *The American Journal of Human Genetics* 95 (2):143-61. https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2014.06.014.
- Bot, S. T. de, R. T. M. van den Elzen, A. R. Mensenkamp, H. J. Schelhaas, M. A. A. P. Willemsen, N. V.
  A. M. Knoers, H. P. H. Kremer, B. P. C. van de Warrenburg, et H. Scheffer. 2010. « Hereditary Spastic Paraplegia Due to SPAST Mutations in 151 Dutch Patients: New Clinical Aspects and 27 Novel Mutations ». *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 81 (10):1073-78. https://doi.org/10.1136/jnnp.2009.201103.
- Bürger, Joachim, Nuria Fonknechten, Maria Hoeltzenbein, Luitgart Neumann, Elfriede Bratanoff, Jamilé Hazan, et André Reis. 2000. « Hereditary spastic paraplegia caused by mutations in the SPG4 gene ». *European journal of human genetics: EJHG* 8 (10):771.
- Burgo, Andrea, Véronique Proux-Gillardeaux, Emmanuel Sotirakis, Philippe Bun, Alessandra Casano, Agathe Verraes, Ronald K.H. Liem, Etienne Formstecher, Maïté Coppey-Moisan, et Thierry Galli. 2012. « A Molecular Network for the Transport of the TI-VAMP/VAMP7 Vesicles from Cell Center to Periphery ». *Developmental Cell* 23 (1):166-80. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2012.04.019.
- Burgo, Andrea, Emmanuel Sotirakis, Marie-Christine Simmler, Agathe Verraes, Christophe Chamot, Jeremy C Simpson, Letizia Lanzetti, Véronique Proux-Gillardeaux, et Thierry Galli. 2009.
   « Role of Varp, a Rab21 exchange factor and TI-VAMP/VAMP7 partner, in neurite growth ». *EMBO reports* 10 (10):1117-24. https://doi.org/10.1038/embor.2009.186.
- Burton, P. R., et J. L. Paige. 1981. « Polarity of Axoplasmic Microtubules in the Olfactory Nerve of the Frog ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78 (5):3269-73.
- Butler, R., J. D. Wood, J. A. Landers, et V. T. Cunliffe. 2010. « Genetic and Chemical Modulation of Spastin-Dependent Axon Outgrowth in Zebrafish Embryos Indicates a Role for Impaired Microtubule Dynamics in Hereditary Spastic Paraplegia ». *Disease Models & Mechanisms* 3 (11-12):743-51. https://doi.org/10.1242/dmm.004002.
- Campbell, Patrick K., Katrina G. Waymire, Robb L. Heier, Catherine Sharer, Diane E. Day, Heike Reimann, J. Michael Jaje, Glenn A. Friedrich, Margit Burmeister, et Timothy J. Bartness. 2002. « Mutation of a novel gene results in abnormal development of spermatid flagella, loss of intermale aggression and reduced body fat in mice ». *Genetics* 162 (1):307–320.

- Charvin, D. 2003. « Mutations of SPG4 are responsible for a loss of function of spastin, an abundant neuronal protein localized in the nucleus ». *Human Molecular Genetics* 12 (1):71-78. https://doi.org/10.1093/hmg/ddg004.
- Claudiani, P, E Riano, A Errico, G Andolfi, et E Rugarli. 2005. « Spastin Subcellular Localization Is Regulated through Usage of Different Translation Start Sites and Active Export from the Nucleus ». *Experimental Cell Research* 309 (2):358-69. https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2005.06.009.
- Connell, James W., Rachel Allison, et Evan Reid. 2016. « Quantitative Gait Analysis Using a Motorized Treadmill System Sensitively Detects Motor Abnormalities in Mice Expressing ATPase Defective Spastin ». Édité par Andrew James Grierson. *PLOS ONE* 11 (3):e0152413. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152413.
- Connell, James W., Catherine Lindon, J. Paul Luzio, et Evan Reid. 2009. « Spastin Couples Microtubule Severing to Membrane Traffic in Completion of Cytokinesis and Secretion ». *Traffic* 10 (1):42-56. https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2008.00847.x.
- Cotrufo, T., F. Perez-Branguli, A. Muhaisen, O. Ros, R. Andres, T. Baeriswyl, G. Fuschini, et al. 2011. « A Signaling Mechanism Coupling Netrin-1/Deleted in Colorectal Cancer Chemoattraction to SNARE-Mediated Exocytosis in Axonal Growth Cones ». *Journal of Neuroscience* 31 (41):14463-80. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3018-11.2011.
- Creppe, Catherine, Lina Malinouskaya, Marie-Laure Volvert, Magali Gillard, Pierre Close, Olivier Malaise, Sophie Laguesse, et al. 2009. « Elongator Controls the Migration and Differentiation of Cortical Neurons through Acetylation of α-Tubulin ». *Cell* 136 (3):551-64. https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.11.043.
- Danglot, L., K. Zylbersztejn, M. Petkovic, M. Gauberti, H. Meziane, R. Combe, M.-F. Champy, et al. 2012. « Absence of TI-VAMP/Vamp7 Leads to Increased Anxiety in Mice ». *Journal of Neuroscience* 32 (6):1962-68. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4436-11.2012.
- Daste, F., T. Galli, et D. Tareste. 2015. « Structure and Function of Longin SNAREs ». *Journal of Cell Science* 128 (23):4263-72. https://doi.org/10.1242/jcs.178574.
- De Vos, Kurt J., Andrew J. Grierson, Steven Ackerley, et Christopher C.J. Miller. 2008. « Role of Axonal Transport in Neurodegenerative Diseases ». *Annual Review of Neuroscience* 31 (1):151-73. https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.31.061307.090711.
- Denton, Kyle R., Ling Lei, Jeremy Grenier, Vladimir Rodionov, Craig Blackstone, et Xue-Jun Li. 2014. « Loss of Spastin Function Results in Disease-Specific Axonal Defects in Human Pluripotent Stem Cell-Based Models of Hereditary Spastic Paraplegia: Modeling Axonal Defects of HSP in Human Neurons ». *STEM CELLS* 32 (2):414-23. https://doi.org/10.1002/stem.1569.
- Depienne, C., E. Fedirko, S. Forlani, C. Cazeneuve, P. Ribai, I. Feki, C. Tallaksen, et al. 2007. « Exon Deletions of SPG4 Are a Frequent Cause of Hereditary Spastic Paraplegia ». *Journal of Medical Genetics* 44 (4):281-84. https://doi.org/10.1136/jmg.2006.046425.
- Dompierre, J. P., J. D. Godin, B. C. Charrin, F. P. Cordelieres, S. J. King, S. Humbert, et F. Saudou. 2007. « Histone Deacetylase 6 Inhibition Compensates for the Transport Deficit in Huntington's Disease by Increasing Tubulin Acetylation ». *Journal of Neuroscience* 27 (13):3571-83. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0037-07.2007.
- Eckert, T., S. Link, D. T.-V. Le, J.-P. Sobczak, A. Gieseke, K. Richter, et G. Woehlke. 2012. « Subunit Interactions and Cooperativity in the Microtubule-Severing AAA ATPase Spastin ». *Journal of Biological Chemistry* 287 (31):26278-90. https://doi.org/10.1074/jbc.M111.291898.
- Eckert, Thomas, Doan Tuong-Van Le, Susanne Link, Lena Friedmann, et Günther Woehlke. 2012. « Spastin's Microtubule-Binding Properties and Comparison to Katanin ». Édité par Andreas Hofmann. *PLoS ONE* 7 (12):e50161. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050161.
- Erck, Christian, Leticia Peris, Annie Andrieux, Claire Meissirel, Achim D. Gruber, Muriel Vernet, Annie Schweitzer, et al. 2005. « A vital role of tubulin-tyrosine-ligase for neuronal organization ». Proceedings of the National Academy of Sciences 102 (22):7853–7858.

- Errico, A. 2004. « Spastin Interacts with the Centrosomal Protein NA14, and Is Enriched in the Spindle Pole, the Midbody and the Distal Axon ». *Human Molecular Genetics* 13 (18):2121-32. https://doi.org/10.1093/hmg/ddh223.
- Errico, Alessia, Andrea Ballabio, et Elena I. Rugarli. 2002. « Spastin, the Protein Mutated in Autosomal Dominant Hereditary Spastic Paraplegia, Is Involved in Microtubule Dynamics ». *Human Molecular Genetics* 11 (2):153-63.
- Ersfeld, Klaus, Jürgen Wehland, Uwe Plessmann, Huub Dodemont, Volker Gerke, et Klaus Weber. 1993. « Characterization of the tubulin-tyrosine ligase. » *The Journal of cell biology* 120 (3):725–732.
- Evans, Katia J., Edgar R. Gomes, Steven M. Reisenweber, Gregg G. Gundersen, et Brett P. Lauring. 2005. « Linking Axonal Degeneration to Microtubule Remodeling by Spastin-Mediated Microtubule Severing ». *The Journal of Cell Biology* 168 (4):599-606. https://doi.org/10.1083/jcb.200409058.
- Fan, Y., G. Wali, R. Sutharsan, B. Bellette, D. I. Crane, C. M. Sue, et A. Mackay-Sim. 2014. « Low Dose Tubulin-Binding Drugs Rescue Peroxisome Trafficking Deficit in Patient-Derived Stem Cells in Hereditary Spastic Paraplegia ». *Biology Open* 3 (6):494-502. https://doi.org/10.1242/bio.20147641.
- Fassier, C., A. Tarrade, L. Peris, S. Courageot, P. Mailly, C. Dalard, S. Delga, et al. 2013. « Microtubule-Targeting Drugs Rescue Axonal Swellings in Cortical Neurons from Spastin Knockout Mice ». *Disease Models & Mechanisms* 6 (1):72-83. https://doi.org/10.1242/dmm.008946.
- Fink, John K. 2013. « Hereditary Spastic Paraplegia: Clinico-Pathologic Features and Emerging Molecular Mechanisms ». *Acta Neuropathologica* 126 (3):307-28. https://doi.org/10.1007/s00401-013-1115-8.
- Gao, Y. s., C. C. Hubbert, et T. P. Yao. 2010. « The Microtubule-Associated Histone Deacetylase 6 (HDAC6) Regulates Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Endocytic Trafficking and Degradation ». *Journal of Biological Chemistry* 285 (15):11219-26. https://doi.org/10.1074/jbc.M109.042754.
- Goyal, Uma, et Craig Blackstone. 2013. « Untangling the Web: Mechanisms Underlying ER Network Formation ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1833 (11):2492-98. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.04.009.
- Goyal, Uma, Benoît Renvoisé, Jaerak Chang, et Craig Blackstone. 2014. « Spastin-Interacting Protein NA14/SSNA1 Functions in Cytokinesis and Axon Development ». Édité par Matthew Seaman. *PLoS ONE* 9 (11):e112428. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112428.
- Gupton, Stephanie L., et Frank B. Gertler. 2010. « Integrin Signaling Switches the Cytoskeletal and Exocytic Machinery That Drives Neuritogenesis ». *Developmental Cell* 18 (5):725-36. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.02.017.
- Haggarty, Stephen J., Kathryn M. Koeller, Jason C. Wong, Christina M. Grozinger, et Stuart L.
   Schreiber. 2003. « Domain-selective small-molecule inhibitor of histone deacetylase 6 (HDAC6)-mediated tubulin deacetylation ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 (8):4389–4394.
- Hallak, Marta E., J. A. Rodriguez, H. S. Barra, et R. Caputto. 1977. « Release of tyrosine from tyrosinated tubulin. Some common factors that affect this process and the assembly of tubulin ». *FEBS letters* 73 (2):147–150.
- Hammond, Jennetta W., Dawen Cai, et Kristen J. Verhey. 2008. « Tubulin modifications and their cellular functions ». *Current opinion in cell biology* 20 (1):71–76.
- Hammond, Jennetta W., Chun-Fang Huang, Stefanie Kaech, Catherine Jacobson, Gary Banker, et Kristen J. Verhey. 2010. « Posttranslational modifications of tubulin and the polarized transport of kinesin-1 in neurons ». *Molecular biology of the cell* 21 (4):572–583.

- Havlicek, S., Z. Kohl, H. K. Mishra, I. Prots, E. Eberhardt, N. Denguir, H. Wend, et al. 2014. « Gene Dosage-Dependent Rescue of HSP Neurite Defects in SPG4 Patients' Neurons ». *Human Molecular Genetics* 23 (10):2527-41. https://doi.org/10.1093/hmg/ddt644.
- Hazan, Jamilé, Nùria Fonknechten, Delphine Mavel, Caroline Paternotte, Delphine Samson, François Artiguenave, Claire-Sophie Davoine, et al. 1999. « Spastin, a new AAA protein, is altered in the most frequent form of autosomal dominant spastic paraplegia ». *Nature genetics* 23 (3):296–303.
- Heidemann, S. R., J. M. Landers, et M. A. Hamborg. 1981. « Polarity Orientation of Axonal Microtubules ». *The Journal of Cell Biology* 91 (3 Pt 1):661-65.
- Henson, Brian J., Wan Zhu, Kelsey Hardaway, Jaime L. Wetzel, Mihaela Stefan, Kathryn M. Albers, et Robert D. Nicholls. 2012. « Transcriptional and Post-Transcriptional Regulation of SPAST, the Gene Most Frequently Mutated in Hereditary Spastic Paraplegia ». Édité par Mark R. Cookson. *PLoS ONE* 7 (5):e36505. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036505.
- Hu, Junjie, Yoko Shibata, Peng-Peng Zhu, Christiane Voss, Neggy Rismanchi, William A. Prinz, Tom A.
   Rapoport, et Craig Blackstone. 2009. « A class of dynamin-like GTPases involved in the generation of the tubular ER network ». *Cell* 138 (3):549–561.
- Hua, Zhaolin, Sergio Leal-Ortiz, Sarah M. Foss, Clarissa L. Waites, Craig C. Garner, Susan M.
   Voglmaier, et Robert H. Edwards. 2011. « V-SNARE Composition Distinguishes Synaptic Vesicle Pools ». *Neuron* 71 (3):474-87. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.06.010.
- Hurley, James H. 2008. « ESCRT complexes and the biogenesis of multivesicular bodies ». *Current* opinion in cell biology 20 (1):4–11.
- Ikegami, Koji, Robb L. Heier, Midori Taruishi, Hiroshi Takagi, Masahiro Mukai, Shuichi Shimma, Shu Taira, Ken Hatanaka, Nobuhiro Morone, et Ikuko Yao. 2007. « Loss of α-tubulin polyglutamylation in ROSA22 mice is associated with abnormal targeting of KIF1A and modulated synaptic function ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (9):3213–3218.
- Janke, Carsten. 2014. « The Tubulin Code: Molecular Components, Readout Mechanisms, and Functions ». *The Journal of Cell Biology* 206 (4):461-72. https://doi.org/10.1083/jcb.201406055.
- Kasher, Paul R., Kurt J. De Vos, Stephen B. Wharton, Catherine Manser, Ellen J. Bennett, Megan Bingley, Jonathan D. Wood, et al. 2009. « Direct Evidence for Axonal Transport Defects in a Novel Mouse Model of Mutant Spastin-Induced Hereditary Spastic Paraplegia (HSP) and Human HSP Patients ». *Journal of Neurochemistry* 110 (1):34-44. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06104.x.
- Kawaguchi, Yoshiharu, Jeffrey J. Kovacs, Adam McLaurin, Jeffery M. Vance, Akihiro Ito, et Tso-Pang Yao. 2003. « The deacetylase HDAC6 regulates aggresome formation and cell viability in response to misfolded protein stress ». *Cell* 115 (6):727–738.
- Keating, T. J., J. G. Peloquin, V. I. Rodionov, D. Momcilovic, et G. G. Borisy. 1997. « Microtubule release from the centrosome ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94 (10):5078–5083.
- Keating, Thomas J., et Gary G. Borisy. 1999. « Centrosomal and non-centrosomal microtubules ». *Biology of the Cell* 91 (4-5):321–329.
- Konishi, Yoshiyuki, et Mitsutoshi Setou. 2009. « Tubulin tyrosination navigates the kinesin-1 motor domain to axons ». *Nature Neuroscience* 12 (5):559-67. https://doi.org/10.1038/nn.2314.
- Kubo, Tomohiro, Haru-aki Yanagisawa, Toshiki Yagi, Masafumi Hirono, et Ritsu Kamiya. 2010. « Tubulin Polyglutamylation Regulates Axonemal Motility by Modulating Activities of Inner-Arm Dyneins ». *Current Biology* 20 (5):441-45. https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.12.058.
- Lacroix, Benjamin, Juliette van Dijk, Nicholas D. Gold, Julien Guizetti, Gudrun Aldrian-Herrada, Krzysztof Rogowski, Daniel W. Gerlich, et Carsten Janke. 2010. « Tubulin Polyglutamylation

Stimulates Spastin-Mediated Microtubule Severing ». *The Journal of Cell Biology* 189 (6):945-54. https://doi.org/10.1083/jcb.201001024.

- Larcher, Jean-Christophe, Dominique Boucher, Sylvie Lazereg, François Gros, et Philippe Denoulet. 1996. « Interaction of Kinesin Motor Domains with α-and β-Tubulin Subunits at a Tauindependent Binding Site REGULATION BY POLYGLUTAMYLATION ». *Journal of Biological Chemistry* 271 (36):22117–22124.
- Le, Doan Tuong-Van, Thomas Eckert, et Günther Woehlke. 2013. « Computer Simulation of Assembly and Co-Operativity of Hexameric AAA ATPases ». Édité par Freddie Salsbury. *PLoS ONE* 8 (7):e67815. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067815.
- LeDizet, Michel, et Gianni Piperno. 1987. « Identification of an acetylation site of Chlamydomonas alpha-tubulin ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 84 (16):5720–5724.
- Leo, Lanfranco, Carina Weissmann, Matthew Burns, Minsu Kang, Yuyu Song, Liang Qiang, Scott T. Brady, Peter W. Baas, et Gerardo Morfini. 2017. « Mutant Spastin Proteins Promote Deficits in Axonal Transport through an Isoform-Specific Mechanism Involving Casein Kinase 2 Activation ». *Human Molecular Genetics*, avril. https://doi.org/10.1093/hmg/ddx125.
- Li, Y., et M. M. Black. 1996. « Microtubule Assembly and Turnover in Growing Axons ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 16 (2):531-44.
- Liu, Xin-An, Valerio Rizzo, et Sathyanarayanan Puthanveettil. 2012. « Pathologies of axonal transport in neurodegenerative diseases ». *Translational Neuroscience* 3 (4). https://doi.org/10.2478/s13380-012-0044-7.
- Lo Giudice, Temistocle, Federica Lombardi, Filippo Maria Santorelli, Toshitaka Kawarai, et Antonio Orlacchio. 2014. « Hereditary Spastic Paraplegia: Clinical-Genetic Characteristics and Evolving Molecular Mechanisms ». *Experimental Neurology* 261 (novembre):518-39. https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2014.06.011.
- Lumb, Jennifer H., James W. Connell, Rachel Allison, et Evan Reid. 2012. « The AAA ATPase Spastin Links Microtubule Severing to Membrane Modelling ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* -*Molecular Cell Research* 1823 (1):192-97. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.08.010.
- Lykke-Andersen, Søren, et Torben Heick Jensen. 2015. « Nonsense-Mediated MRNA Decay: An Intricate Machinery That Shapes Transcriptomes ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 16 (11):665-77. https://doi.org/10.1038/nrm4063.
- Lyser, K. M. 1964. « EARLY DIFFERENTIATION OF MOTOR NEUROBLASTS IN THE CHICK EMBRYO AS STUDIED BY ELECTRON MICROSCOPY. I. GENERAL ASPECTS ». *Developmental Biology* 10 (décembre):433-66.
- ———. 1968. « An Electron-Microscopic Study of Centrioles in Differentiating Motor Neuroblasts ». Journal of Embryology and Experimental Morphology 20 (3):343-54.
- Maas, Christoph, Dorthe Belgardt, Han Kyu Lee, Frank F. Heisler, Corinna Lappe-Siefke, Maria M.
   Magiera, Juliette van Dijk, Torben J. Hausrat, Carsten Janke, et Matthias Kneussel. 2009.
   « Synaptic activation modifies microtubules underlying transport of postsynaptic cargo ».
   Proceedings of the National Academy of Sciences 106 (21):8731–8736.
- Mackeh, Rafah, Séverine Lorin, Ameetha Ratier, Najet Mejdoubi-Charef, Anita Baillet, Arnaud Bruneel, Ahmed Hamaï, Patrice Codogno, Christian Poüs, et Daniel Perdiz. 2014. « Reactive Oxygen Species, AMP-Activated Protein Kinase, and the Transcription Cofactor P300 Regulate α-Tubulin Acetyltransferase-1 (ATAT-1/MEC-17)-Dependent Microtubule Hyperacetylation during Cell Stress ». *The Journal of Biological Chemistry* 289 (17):11816-28. https://doi.org/10.1074/jbc.M113.507400.
- Mannan, Ashraf U., Johann Boehm, Simone M. Sauter, Anne Rauber, Paula C. Byrne, Juergen Neesen, et Wolfgang Engel. 2006. « Spastin, the Most Commonly Mutated Protein in Hereditary Spastic Paraplegia Interacts with Reticulon 1 an Endoplasmic Reticulum Protein ». *Neurogenetics* 7 (2):93-103. https://doi.org/10.1007/s10048-006-0034-4.

- Mannan, Ashraf U., Philip Krawen, Simone M. Sauter, Johann Boehm, Agnieszka Chronowska, Walter Paulus, Juergen Neesen, et Wolfgang Engel. 2006. « ZFYVE27 (SPG33), a novel spastinbinding protein, is mutated in hereditary spastic paraplegia ». *The American Journal of Human Genetics* 79 (2):351–357.
- Marcos, S?verine, Julie Moreau, St?phanie Backer, Didier Job, Annie Andrieux, et Evelyne Bloch-Gallego. 2009. « Tubulin Tyrosination Is Required for the Proper Organization and Pathfinding of the Growth Cone ». Édité par Michael Hendricks. *PLoS ONE* 4 (4):e5405. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005405.
- Martin, MaryAnn, Stanley J. Iyadurai, Andrew Gassman, Joseph G. Gindhart, Thomas S. Hays, et William M. Saxton. 1999. « Cytoplasmic dynein, the dynactin complex, and kinesin are interdependent and essential for fast axonal transport ». *Molecular biology of the cell* 10 (11):3717–3728.
- Martinez-Arca, Sonia, Philipp Alberts, Ahmed Zahraoui, Daniel Louvard, et Thierry Galli. 2000. « Role of tetanus neurotoxin insensitive vesicle-associated membrane protein (TI-VAMP) in vesicular transport mediating neurite outgrowth ». *The Journal of cell biology* 149 (4):889–900.
- Martinez-Arca, Sonia, Silvia Coco, Gaëll Mainguy, Ursula Schenk, Philipp Alberts, Pascale Bouillé, Mauro Mezzina, et al. 2001. « A common exocytotic mechanism mediates axonal and dendritic outgrowth ». *Journal of Neuroscience* 21 (11):3830–3838.
- Matsuzaki, Fumiko, Michiko Shirane, Masaki Matsumoto, et Keiichi I. Nakayama. 2011. « Protrudin serves as an adaptor molecule that connects KIF5 and its cargoes in vesicular transport during process formation ». *Molecular biology of the cell* 22 (23):4602–4620.
- McDermott, Christopher J., Andrew J. Grierson, Jonathan D. Wood, Megan Bingley, Stephen B. Wharton, Katharine Bushby, et Pamela J. Shaw. 2003. « Hereditary spastic paraparesis: disrupted intracellular transport associated with spastin mutation ». *Annals of neurology* 54 (6):748–759.
- Millecamps, Stéphanie, et Jean-Pierre Julien. 2013. « Axonal transport deficits and neurodegenerative diseases ». *Nature Reviews Neuroscience* 14 (3):161-76. https://doi.org/10.1038/nrn3380.
- Molon, Annamaria, Pasquale Montagna, Corrado Angelini, et Elena Pegoraro. 2003. « Novel spastin mutations and their expression analysis in two Italian families ». *European Journal of Human Genetics* 11 (9):710-13. https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201027.
- Montenegro, Gladys, Adriana P. Rebelo, James Connell, Rachel Allison, Carla Babalini, Michela D'Aloia, Pasqua Montieri, et al. 2012. « Mutations in the ER-Shaping Protein Reticulon 2 Cause the Axon-Degenerative Disorder Hereditary Spastic Paraplegia Type 12 ». *Journal of Clinical Investigation* 122 (2):538-44. https://doi.org/10.1172/JCI60560.
- Moutin, Marie-Jo, Annie Andrieux, et Carsten Janke. 2011. « Polyglutamylation des microtubules et neurodégénérescence ». *médecine/sciences* 27 (5):464-67. https://doi.org/10.1051/medsci/2011275006.
- Murakami, Midori, et Hiromasa Kijima. 2000. « Transduction ion channels directly gated by sugars on the insect taste cell ». *The Journal of general physiology* 115 (4):455–466.
- Novarino, G., A. G. Fenstermaker, M. S. Zaki, M. Hofree, J. L. Silhavy, A. D. Heiberg, M. Abdellateef, et al. 2014. « Exome Sequencing Links Corticospinal Motor Neuron Disease to Common Neurodegenerative Disorders ». *Science* 343 (6170):506-11. https://doi.org/10.1126/science.1247363.
- Ochoa, C. D., T. Stevens, et R. Balczon. 2011. « Cold Exposure Reveals Two Populations of Microtubules in Pulmonary Endothelia ». *AJP: Lung Cellular and Molecular Physiology* 300 (1):L132-38. https://doi.org/10.1152/ajplung.00185.2010.

- Orso, G. 2005. « Disease-Related Phenotypes in a Drosophila Model of Hereditary Spastic Paraplegia Are Ameliorated by Treatment with Vinblastine ». *Journal of Clinical Investigation* 115 (11):3026-34. https://doi.org/10.1172/JCI24694.
- Pantakani, D. V. Krishna, Marta M. Czyzewska, Anna Sikorska, Chiranjeevi Bodda, et Ashraf U. Mannan. 2011. « Oligomerization of ZFYVE27 (Protrudin) Is Necessary to Promote Neurite Extension ». Édité par Maria Gasset. *PLoS ONE* 6 (12):e29584. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029584.
- Pantakani, D. V. Krishna, Lakshmipuram S. Swapna, Narayanaswamy Srinivasan, et Ashraf U. Mannan. 2008. « Spastin Oligomerizes into a Hexamer and the Mutant Spastin (E442Q) Redistribute the Wild-Type Spastin into Filamentous Microtubule ». *Journal of Neurochemistry* 106 (2):613-24. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05414.x.
- Papadopoulos, Chrisovalantis, Genny Orso, Giuseppe Mancuso, Marija Herholz, Sentiljana Gumeni, Nimesha Tadepalle, Christian Jüngst, et al. 2015. « Spastin Binds to Lipid Droplets and Affects Lipid Metabolism ». Édité par Kaveh Ashrafi. *PLOS Genetics* 11 (4):e1005149. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005149.
- Park, Eun-Chung, et Jack W. Szostak. 1992. « ARD1 and NAT1 proteins form a complex that has N-terminal acetyltransferase activity. » *The EMBO journal* 11 (6):2087.
- Park, Seong H., Peng-Peng Zhu, Rell L. Parker, et Craig Blackstone. 2010. « Hereditary Spastic Paraplegia Proteins REEP1, Spastin, and Atlastin-1 Coordinate Microtubule Interactions with the Tubular ER Network ». *Journal of Clinical Investigation* 120 (4):1097-1110. https://doi.org/10.1172/JCI40979.
- Paturle-Lafanechère, Laurence, Monique Manier, Nathalie Trigault, Fabienne Pirollet, Honoré Mazarguil, et Didier Job. 1994. « Accumulation of delta 2-tubulin, a major tubulin variant that cannot be tyrosinated, in neuronal tissues and in stable microtubule assemblies ». *Journal of Cell Science* 107 (6):1529–1543.
- Peris, Leticia, Manuel Thery, Julien Fauré, Yasmina Saoudi, Laurence Lafanechère, John K. Chilton, Phillip Gordon-Weeks, et al. 2006. « Tubulin Tyrosination Is a Major Factor Affecting the Recruitment of CAP-Gly Proteins at Microtubule plus Ends ». *The Journal of Cell Biology* 174 (6):839-49. https://doi.org/10.1083/jcb.200512058.
- Piehl, Michelle, U. Serdar Tulu, Pat Wadsworth, et Lynne Cassimeris. 2004. « Centrosome maturation: measurement of microtubule nucleation throughout the cell cycle by using GFP-tagged EB1 ». Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 101 (6):1584–1588.
- Plaud, C., V. Joshi, M. Marinello, D. Pastré, T. Galli, P.A. Curmi, et A. Burgo. 2017. « Spastin Regulates VAMP7-Containing Vesicles Trafficking in Cortical Neurons ». *Biochimica et Biophysica Acta* (*BBA*) - *Molecular Basis of Disease* 1863 (6):1666-77. https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.04.007.
- Popp, Maximilian W., et Lynne E. Maquat. 2016. « Leveraging Rules of Nonsense-Mediated MRNA Decay for Genome Engineering and Personalized Medicine ». *Cell* 165 (6):1319-22. https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.053.
- Qiang, Liang, Wenqian Yu, Mei Liu, Joanna M. Solowska, et Peter W. Baas. 2010. « Basic fibroblast growth factor elicits formation of interstitial axonal branches via enhanced severing of microtubules ». *Molecular biology of the cell* 21 (2):334–344.
- Racis, Loretta, Eugenia Storti, Maura Pugliatti, Virgilio Agnetti, Alessandra Tessa, et Filippo M. Santorelli. 2014. « Novel SPAST deletion and reduced DPY30 expression in a Spastic Paraplegia type 4 kindred ». BMC medical genetics 15 (1):39.

Ramage, Lindsay. 2012. « Posts Tagged 'tubulins' ». Cell Health and Cytoskeleton 4:1–9.

Reed, Nathan A., Dawen Cai, T. Lynne Blasius, Gloria T. Jih, Edgar Meyhofer, Jacek Gaertig, et Kristen J. Verhey. 2006. « Microtubule Acetylation Promotes Kinesin-1 Binding and Transport ». *Current Biology* 16 (21):2166-72. https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.09.014.

- Regnard, C. 2003. « Characterisation of PGs1, a Subunit of a Protein Complex Co-Purifying with Tubulin Polyglutamylase ». *Journal of Cell Science* 116 (20):4181-90. https://doi.org/10.1242/jcs.00743.
- Reid, E. 2004. « The Hereditary Spastic Paraplegia Protein Spastin Interacts with the ESCRT-III Complex-Associated Endosomal Protein CHMP1B ». *Human Molecular Genetics* 14 (1):19-38. https://doi.org/10.1093/hmg/ddi003.
- Reid, Evan, Mark Kloos, Allison Ashley-Koch, Lori Hughes, Simon Bevan, Ingrid K. Svenson, Felicia Lennon Graham, et al. 2002. « A kinesin heavy chain (KIF5A) mutation in hereditary spastic paraplegia (SPG10) ». *The American Journal of Human Genetics* 71 (5):1189–1194.
- Renvoisé, Benoît, et Craig Blackstone. 2010. « Emerging Themes of ER Organization in the Development and Maintenance of Axons ». *Current Opinion in Neurobiology* 20 (5):531-37. https://doi.org/10.1016/j.conb.2010.07.001.
- Riano, Elena, Monica Martignoni, Giuseppe Mancuso, Daniele Cartelli, Francesca Crippa, Irene Toldo, Gabriele Siciliano, et al. 2009. « Pleiotropic Effects of Spastin on Neurite Growth Depending on Expression Levels ». *Journal of Neurochemistry* 108 (5):1277-88. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.05875.x.
- Roll-Mecak, Antonina, et Francis J McNally. 2010. « Microtubule-Severing Enzymes ». *Current Opinion in Cell Biology* 22 (1):96-103. https://doi.org/10.1016/j.ceb.2009.11.001.
- Roll-Mecak, Antonina, et Ronald D. Vale. 2005. « The Drosophila Homologue of the Hereditary Spastic Paraplegia Protein, Spastin, Severs and Disassembles Microtubules ». *Current Biology* 15 (7):650-55. https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.02.029.
- ———. 2006. « Making More Microtubules by Severing: A Common Theme of Noncentrosomal Microtubule Arrays?: Figure 1. » *The Journal of Cell Biology* 175 (6):849-51. https://doi.org/10.1083/jcb.200611149.
- Scheuber, Anita, Rachel Rudge, Lydia Danglot, Graca Raposo, Thomas Binz, Jean-Christophe Poncer, et Thierry Galli. 2006. « Loss of AP-3 function affects spontaneous and evoked release at hippocampal mossy fiber synapses ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (44):16562–16567.
- Schröder, Heinz C., Jorgen Wehland, et Klaus Weber. 1985. « Purification of brain tubulin-tyrosine ligase by biochemical and immunological methods. » *The Journal of cell biology* 100 (1):276– 281.
- Sharp, D. J., et J. L. Ross. 2012. « Microtubule-Severing Enzymes at the Cutting Edge ». *Journal of Cell Science* 125 (11):2561-69. https://doi.org/10.1242/jcs.101139.
- Sherwood, Nina Tang, Qi Sun, Mingshan Xue, Bing Zhang, et Kai Zinn. 2004. « Drosophila Spastin Regulates Synaptic Microtubule Networks and Is Required for Normal Motor Function ». Édité par Michael Bate. *PLoS Biology* 2 (12):e429. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020429.
- Shida, T., J. G. Cueva, Z. Xu, M. B. Goodman, et M. V. Nachury. 2010. « The Major -Tubulin K40 Acetyltransferase TAT1 Promotes Rapid Ciliogenesis and Efficient Mechanosensation ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (50):21517-22. https://doi.org/10.1073/pnas.1013728107.
- Solowska, J. M., M. D'Rozario, D. C. Jean, M. W. Davidson, D. R. Marenda, et P. W. Baas. 2014. « Pathogenic Mutation of Spastin Has Gain-of-Function Effects on Microtubule Dynamics ». *Journal of Neuroscience* 34 (5):1856-67. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3309-13.2014.
- Solowska, J. M., J. Y. Garbern, et P. W. Baas. 2010. « Evaluation of Loss of Function as an Explanation for SPG4-Based Hereditary Spastic Paraplegia ». *Human Molecular Genetics* 19 (14):2767-79. https://doi.org/10.1093/hmg/ddq177.

- Solowska, J. M., G. Morfini, A. Falnikar, B. T. Himes, S. T. Brady, D. Huang, et P. W. Baas. 2008.
   « Quantitative and Functional Analyses of Spastin in the Nervous System: Implications for Hereditary Spastic Paraplegia ». *Journal of Neuroscience* 28 (9):2147-57. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3159-07.2008.
- Solowska, Joanna M., et Peter W. Baas. 2015. « Hereditary Spastic Paraplegia SPG4: What Is Known and Not Known about the Disease ». *Brain* 138 (9):2471-84. https://doi.org/10.1093/brain/awv178.
- Song, Yuyu, et Scott T. Brady. 2015. « Post-Translational Modifications of Tubulin: Pathways to Functional Diversity of Microtubules ». *Trends in Cell Biology* 25 (3):125-36. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2014.10.004.
- Stokin, G. B. 2005. « Axonopathy and Transport Deficits Early in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease ». *Science* 307 (5713):1282-88. https://doi.org/10.1126/science.1105681.
- Stuible, M., N. Dube, et M. L. Tremblay. 2008. « PTP1B Regulates Cortactin Tyrosine Phosphorylation by Targeting Tyr446 ». *Journal of Biological Chemistry* 283 (23):15740-46. https://doi.org/10.1074/jbc.M710534200.
- Sudo, H., et P. W. Baas. 2010. « Acetylation of Microtubules Influences Their Sensitivity to Severing by Katanin in Neurons and Fibroblasts ». *Journal of Neuroscience* 30 (21):7215-26. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0048-10.2010.
- Svenson, Ingrid K., Allison E. Ashley-Koch, P. Craig Gaskell, Travis J. Riney, WJ Ken Cumming, Helen M. Kingston, Edward L. Hogan, et al. 2001. « Identification and expression analysis of spastin gene mutations in hereditary spastic paraplegia ». *The American Journal of Human Genetics* 68 (5):1077–1085.
- Takemura, REIKO, SHIGEO Okabe, TAKASHIGE Umeyama, YOSHIMITSU Kanai, NICHOLAS J. Cowan, et NOBUTAKA Hirokawa. 1992. « Increased microtubule stability and alpha tubulin acetylation in cells transfected with microtubule-associated proteins MAP1B, MAP2 or tau ». *Journal of cell science* 103 (4):953–964.
- Tanenbaum, Marvin E., Luke A. Gilbert, Lei S. Qi, Jonathan S. Weissman, et Ronald D. Vale. 2014. « A Protein-Tagging System for Signal Amplification in Gene Expression and Fluorescence Imaging ». *Cell* 159 (3):635-46. https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.039.
- Tang, Beisha, Guohua Zhao, Kun Xia, Qian Pan, Wei Luo, Lu Shen, Zhigao Long, Heping Dai, Xiaohong Zi, et Hong Jiang. 2004. « Three Novel Mutations of the Spastin Gene in Chinese Patients with Hereditary Spastic Paraplegia ». Archives of Neurology 61 (1):49-55. https://doi.org/10.1001/archneur.61.1.49.
- Tarrade, A., C. Fassier, S. Courageot, D. Charvin, J. Vitte, L. Peris, A. Thorel, et al. 2006. « A Mutation of Spastin Is Responsible for Swellings and Impairment of Transport in a Region of Axon Characterized by Changes in Microtubule Composition ». *Human Molecular Genetics* 15 (24):3544-58. https://doi.org/10.1093/hmg/ddl431.
- Taylor, Jennifer L., Susan Roehl White, Brett Lauring, et F.Jon Kull. 2012. « Crystal Structure of the Human Spastin AAA Domain ». *Journal of Structural Biology* 179 (2):133-37. https://doi.org/10.1016/j.jsb.2012.03.002.
- Trotta, Nick, Genny Orso, Maria Giovanna Rossetto, Andrea Daga, et Kendal Broadie. 2004. « The hereditary spastic paraplegia gene, spastin, regulates microtubule stability to modulate synaptic structure and function ». *Current biology* 14 (13):1135–1147.
- Tsaneva-Atanasova, Krasimira, Andrea Burgo, Thierry Galli, et David Holcman. 2009. « Quantifying Neurite Growth Mediated by Interactions among Secretory Vesicles, Microtubules, and Actin Networks ». *Biophysical Journal* 96 (3):840-57. https://doi.org/10.1016/j.bpj.2008.10.036.
- Valdmanis, Paul N., Inge A. Meijer, Annie Reynolds, Adrienne Lei, Patrick MacLeod, David Schlesinger, Mayana Zatz, et al. 2007. « Mutations in the KIAA0196 Gene at the SPG8 Locus Cause Hereditary Spastic Paraplegia ». *American Journal of Human Genetics* 80 (1):152-61. https://doi.org/10.1086/510782.

- Valenstein, Max L., et Antonina Roll-Mecak. 2016. « Graded Control of Microtubule Severing by Tubulin Glutamylation ». *Cell* 164 (5):911-21. https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.01.019.
- Voeltz, Gia K., William A. Prinz, Yoko Shibata, Julia M. Rist, et Tom A. Rapoport. 2006. « A Class of Membrane Proteins Shaping the Tubular Endoplasmic Reticulum ». *Cell* 124 (3):573-86. https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.11.047.
- Wang, Lei, et Anthony Brown. 2002. « Rapid movement of microtubules in axons ». *Current Biology* 12 (17):1496–1501.
- Ward, Diane McVey, Jonathan Pevsner, Matthew A. Scullion, Michael Vaughn, et Jerry Kaplan. 2000.
   « Syntaxin 7 and VAMP-7 are SolubleN-Ethylmaleimide–sensitive Factor Attachment Protein Receptors Required for Late Endosome–Lysosome and Homotypic Lysosome Fusion in Alveolar Macrophages ». *Molecular biology of the cell* 11 (7):2327–2333.
- Webster, Daniel R., Juergen Wehland, Klaus Weber, et Gary G. Borisy. 1990. « Detyrosination of alpha tubulin does not stabilize microtubules in vivo. » *The Journal of Cell Biology* 111 (1):113–122.
- Wen, Maorong, et Chunguang Wang. 2013. « The Nucleotide Cycle of Spastin Correlates with Its Microtubule-Binding Properties ». FEBS Journal 280 (16):3868-77. https://doi.org/10.1111/febs.12385.
- Westermann, Stefan, et Klaus Weber. 2003. « Post-translational modifications regulate microtubule function ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 4 (12):938-48. https://doi.org/10.1038/nrm1260.
- White, Susan Roehl, Katia J. Evans, Jeffrey Lary, James L. Cole, et Brett Lauring. 2007. « Recognition of C-Terminal Amino Acids in Tubulin by Pore Loops in Spastin Is Important for Microtubule Severing ». *The Journal of Cell Biology* 176 (7):995-1005. https://doi.org/10.1083/jcb.200610072.
- White, Susan Roehl, et Brett Lauring. 2007. « AAA+ ATPases: Achieving Diversity of Function with Conserved Machinery ». *Traffic* 8 (12):1657-67. https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2007.00642.x.
- Witte, Harald, Dorothee Neukirchen, et Frank Bradke. 2008. « Microtubule Stabilization Specifies Initial Neuronal Polarization ». *The Journal of Cell Biology* 180 (3):619-32. https://doi.org/10.1083/jcb.200707042.
- Wojnacki, José, et Thierry Galli. 2016. « Membrane Traffic during Axon Development: Membrane Traffic ». *Developmental Neurobiology* 76 (11):1185-1200. https://doi.org/10.1002/dneu.22390.
- Wood, J. D. 2006. « The Microtubule-Severing Protein Spastin Is Essential for Axon Outgrowth in the Zebrafish Embryo ». *Human Molecular Genetics* 15 (18):2763-71. https://doi.org/10.1093/hmg/ddl212.
- Yang, Dong, Neggy Rismanchi, Benoît Renvoisé, Jennifer Lippincott-Schwartz, Craig Blackstone, et James H Hurley. 2008. « Structural basis for midbody targeting of spastin by the ESCRT-III protein CHMP1B ». *Nature Structural & Molecular Biology* 15 (12):1278-86. https://doi.org/10.1038/nsmb.1512.
- Yu, Wenqian, Victoria E. Centonze, Fridoon J. Ahmad, et Peter W. Baas. 1993. « Microtubule nucleation and release from the neuronal centrosome ». *The Journal of Cell Biology* 122 (2):349–359.
- Zempel, Hans, et Eva-Maria Mandelkow. 2015. « Tau Missorting and Spastin-Induced Microtubule Disruption in Neurodegeneration: Alzheimer Disease and Hereditary Spastic Paraplegia ». *Molecular Neurodegeneration* 10 (1). https://doi.org/10.1186/s13024-015-0064-1.
- Zhao, X., D. Alvarado, S. Rainier, R. Lemons, P. Hedera, C. H. Weber, T. Tukel, et al. 2001. « Mutations in a Newly Identified GTPase Gene Cause Autosomal Dominant Hereditary Spastic Paraplegia ». Nature Genetics 29 (3):326-31. https://doi.org/10.1038/ng758.

Züchner, Stephan, Gaofeng Wang, Khanh-Nhat Tran-Viet, Martha A. Nance, Perry C. Gaskell, Jeffery M. Vance, Allison E. Ashley-Koch, et Margaret A. Pericak-Vance. 2006. « Mutations in the Novel Mitochondrial Protein REEP1 Cause Hereditary Spastic Paraplegia Type 31 ». American Journal of Human Genetics 79 (2):365-69. https://doi.org/10.1086/505361.


Contents lists available at ScienceDirect

# BBA - Molecular Basis of Disease



journal homepage: www.elsevier.com

# Spastin regulates VAMP7-containing vesicles trafficking in cortical neurons

C. Plaud<sup>a, 1</sup>, V. Joshi<sup>a, 1</sup>, M. Marinello<sup>a</sup>, D. Pastré<sup>a</sup>, T. Galli<sup>b</sup>, P.A. Curmi<sup>a</sup>, A. Burgo<sup>a, \*</sup>

<sup>a</sup> Structure and Activity of Normal and Pathological Biomolecules, INSERM U1204, Université Paris-Saclay, Université d' Evry, France
 <sup>b</sup> Inserm URL U950, Institut Jacques Monod, France.

# ARTICLE INFO

Keywords: Human Spastic Paraplegia SPG4 Axonal transport VAMP7 Microtubule targeting agents

# ABSTRACT

Alteration of axonal transport has emerged as a common precipitating factor in several neurodegenerative disorders including Human Spastic Paraplegia (HSP). Mutations of the *SPAST* (*SPG4*) gene coding for the spastin protein account for 40% of all autosomal dominant uncomplicated HSP. By cleaving microtubules, spastin regulates several cellular processes depending on microtubule dynamics including intracellular membrane trafficking. Axonal transport is fundamental for the viability of motor neurons which often have very long axons and thus require efficient communication between the cell body and its periphery. Here we found that the anterograde velocity of VAMP7 vesicles, but not that of VAMP2, two vesicular-SNARE proteins implicated in neuronal development, is enhanced in SPG4-KO neurons. We showed that this effect is associated with a slight increase of the level of acetylated tubulin in SPG4-KO neurons and correlates with an enhanced activity of kinesin-1 motors. Interestingly, we demonstrated that an artificial increase of acetylated tubulin by drugs reproduces the effect of Spastin KO on VAMP7 axonal dynamics but also increased its retrograde velocity. Finally, we investigated the effect of microtubule targeting agents which rescue axonal swellings, on VAMP7 and microtubule dynamics. Our results suggest that microtubule stabilizing agents, such as taxol, may prevent the morphological defects observed in SPG4-KO neurons not simplyby restoring the altered anterograde transport to basal levels but rather by increasing the retrograde velocity of axonal cargoes.

### 1. Introduction

Hereditary spastic paraplegias (HSPs) constitute a group of heterogeneous inherited diseases characterized by a progressive degeneration of the corticospinal tract axons and *fasciculus gracilis fibers* [1]. HSPs have a prevalence of 1–5:100,000 in most populations [2], and to date > 70 loci and 59 genes (spastic paraplegia genes, SPG) have been identified in HSP patients. Progressive lower limb spasticity and weakness are the predominant but not the only characteristics of this group of neurological syndrome [3]. Only symptomatic treatments partially improving spasticity are available for HSP patients, and no preventive or curative measures are yet available [4].

Mutations in the *SPAST* (SPG4 in mice) gene, encoding spastin, account for approximately 40% of the familial and 20% of the sporadic cases within autosomal dominant HSP [5,6]. Spastin is a member of the ATPases Associated with diverse cellular Activities (AAA) protein family [7,8] involved in microtubule severing through an ATP-dependent mechanism [9,10]. By breaking long microtubules into shorter

fragments, spastin regulates microtubule dynamics [11-14] and its activity has been implicated in the control of different microtubule-dependent cellular processes including axonal transport, endosomal recycling, cytokinesis and ER shaping (Reviewed in [8,15]). In neurons, spastin is involved in axonal branching [16] and regeneration [17], synaptic bouton formation [18], neurotransmission [19] and axonal growth receptor-mediated BMP signaling [20]. Studies in SPAST/SPG4 defective neuronal model demonstrated that a reduced expression of spastin may be associated with a lower number of dynamic microtubules [12–14] and an increase of the level of acetylated  $\alpha$ -tubulin [21,22], a posttranslational modification (PTM) of tubulin generally associated with stable microtubules [23,24]. Axonal membrane traffic is also affected with a decreased and imbalanced motility of axonal cargoes, mainly mitochondria, but not of their velocities [22,25,26]. Axonal swelling, the prominent axonal abnormality observed in different SPAST/SPG4 neuronal models and in SPAST human patients [22,25–27], has been linked to microtubule dynamics and axonal transport defects. This was based on the fact that different organelles are

http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.04.007 Received 13 December 2016; Received in revised form 4 April 2017; Accepted 6 April 2017 Available online xxx 0925-4439/ © 2016 Published by Elsevier Ltd.

<sup>\*</sup> Corresponding author.

Email address: andrea.burgo@univ-evry.fr (A. Burgo)

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> These authors equally contribute to this work.

found enriched in these structures [12,25,27] in particular disorganized microtubule network [12,26] and on the observation that microtubule-targeting agents (MTA), such as taxol, vinblastine and nocodazole, at low concentration prevent/rescue such axonal swellings [12,21,22].

Data published up to now suggested that spastin regulates the axonal transport of mitochondria but little is known about the role of this protein in other axonal compartment implicated in the delivery and recycling of membrane, lipids and other cytoplasmic material critical for neuronal development and integrity. The vesicular (v-) Soluble N-ethylmaleimide sensitive factor Attachment Receptors (SNARE) through the interaction with their target (t-) SNAREs, form the so-called trans-SNARE complex which mediates the final step of fusion between two membranes, a process needed for all of biology, from cell division to synaptic transmission [28,29]. Between them, VAMP7 (also called TI-VAMP), is a ubiquitously expressed v-SNARE involved in numerous cellular functions including mitosis, autophagy and membrane homeostasis (for reviews see [30,31]). In neurons, VAMP7 was shown to localize in axons and dendrites and concentrate in the growth cone and has an important role in axonogenesis [32], neurite growth [33-35], pathfinding [36] and it may later be involved in neurotransmitter release [37,38] and higher brain function [39]. Interestingly, the traffic of VAMP7 vesicles has been related to the molecular motor kinesin1 Kif5A [40] and to the cell-cell adhesion molecule L1-CAM [35] two genes linked to HSP, SPG10 [41] and SPG1 [42] respectively. Particularly, the interaction with Kif5A allows VAMP7 positive secretory vesicles formed in the somatic Golgi-apparatus to move along microtubule tracks out of the cell body towards the terminal [40].

Here we demonstrated that the anterograde velocity of VAMP7 containing vesicles is enhanced in cortical neurons derived from SPG4-KO mice. This correlates with a significant increase of the level of acetylated tubulin but no other PTMs of tubulin and is also observed when neuronal cells were treated with drugs that induce an increase of acetylated tubulin. These results suggest that the lack or impairment of spastin expression induces a moderate increased level of acetylated tubulin which enhances the activity of molecular motors of kinesin-1 family and the consequent anterograde velocity of axonal cargoes such as VAMP7 vesicles. Finally, we analyzed the effects of MTA, such as taxol and nocodazole which prevent axonal swellings in SPG4-KO neurons, on microtubule dynamics and membrane traffic. The results support the fact that the rescue of a normal phenotype is not simply due to the restoration of the anterograde transport to basal levels.

### 2. Materials and methods

### 2.1. Antibodies

Mouse monoclonal Ab (mAb) anti-acetylated tubulin (clone6-11B-1) and anti-GAPDH were from Sigma-Aldrich. Mouse mAb anti-KIF5B (KN-01), rabbit polyclonal antibody (pAb) anti-detyrosinated tubulin and rat mAb anti-tyrosinated tubulin (YL 1/2) were from Millipore. Rabbit pAb anti-Polyglutamate chain (polyE) was from Adipogen. Mouse mAb anti-EB1 was from BD Bioscience. Mouse mAb anti  $\beta$ -III tubulin (TUJ1) was from Covance. Mouse mAb anti-spastin (Sp 3G11/1), mouse mAb anti-katanin p60 and goat pAb anti-TAU (C-17) were from Santa Cruz. Rabbit polyclonal anti-stathmin was a kind gift from André Sobel (INSERM, Paris, France). Mouse mAb anti-β-tubulin was produced from the ATCC E7 hybridoma clone. Secondary antibodies for immunofluorescence Alexa Fluor 488- or 594-conjugated goat anti-rabbit, anti-mouse, anti-rat or donkey anti-goat were from Molecular Probes (Carlsbad, CA). Secondary antibodies for immunoblot IRDye 800CW or IRDye 680CW conjugated goat anti-rabbit, anti-mouse or anti-rat were from LI-COR Bioscience (Lincoln, Nebraska, USA).

#### 2.2. cDNA, reagents and drug treatments

mRFP-VAMP7 and GFP-VAMP2 was previously described [43,44]. EB3-GFP was previously described [12]. Mitotracker orange CM-H2 TMROS was from Molecular Probes (Invitrogen). Paclitaxel (Taxol; Sigma-Aldrich), Nocodazole (Sigma-Aldrich) or Trichostatin A (TSA; Tocris) were added to culture medium at the different final concentrations. Taxol and nocodazole were incubated for 14–16 h whereas TSA for 4 h at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub> and maintained during the time-lapse imaging experiment. Drugs were kept as stock solution in DMSO and working dilution were prepared freshly at each day of the experiment. When transfected, neurons were treated with drugs after sufficient rest once the Lipofectamine-containing medium was replaced.

### 2.3. Primary culture of cortical neurons and genotyping

Primary culture of cortical neurons was prepared from embryonic mice (E17) as described previously [45]. Briefly, brains were dissected in HBSS with Hepes (Invitrogen) and incubated with 0.25% trypsin (Invitrogen) for 15 min at 37 °C. Cells were than dissociated through a fire-constricted Pasteur pipette in presence of DNase (0.1 mg/mL; Sigma-Adrich). Neurons were plated on poly-DL-ornithine-coated (Sigma-Aldrich) glass coverslips or petri dishes at the density of 25,000-50,000, 500,000 or 4,000,000 cells respectively for 12-mm, 30-mm and 100-mm coverslip/dish in minimal essential medium (Gibco, Invitrogen) supplemented with 10% horse serum, 0.6% glucose, 2 mM glutamine, and 10 IU/mL penicillin-streptomycin. Embryo genotypes (Fig. S1) were identified during the preparation of culture using the KAPA Mouse Genotyping Kit (Kapabiosystems, Boston, USA). Sp+ and Sp<sup> $\Delta$ </sup> alleles were detected by PCR using the primers *spin7F* or *spin 4F* and spin7R as described previously [27]. Neurons were grown and maintained in Neurobasal medium without phenol red (Invitrogen), supplemented with 2% B27 and 2 mM L-glutamax (Invitrogen) for 4 to 7 days and then processed for analysis.

# 2.4. Immunofluorescence and integrated fluorescence analysis

For PTMs of tubulin analysis, cortical neurons were fixed with 4% PFA-sucrose for 20 min at RT while for EB1 staining, neurons were fixed with methanol for 5 min at -20 °C followed by 4% PFA-sucrose and then processed for immunofluorescence. For PTMs tubulin ratio analysis, the integrated fluorescence intensity was measured after background subtraction for each PTM from the cell body to the growth-cone of the axons by using the Metamorph software (Roper Scientific, Evry, France). The number of axons analyzed for the ratio of acetylated versus tyrosinated tubulin range from 40 to 140 depending on the experimental condition. Data were normalized to the acetylated/tyrosinated ratio of Sp<sup>+/+</sup> untreated cortical neurons cultured the same experimental day. For the ratio of detyrosinated versus tyrosinated tubulin a minimum of 20 axons were considered. Each experiment by using the GraphPad PRISM software.

### 2.5. Immunoblot assays and densitometry analysis

Neurons were lysed at 7-DIV in TSE (50 mM TrisHCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) added of 1% Triton  $\times$  100 and protease inhibitors cocktail (Complete ULTRA Tablets, EDTA-Free, Roche) on ice. Between 4 and 10 µg of lysates for PTMs of tubulin analysis and 25 µg for other proteins were separated by SDS-PAGE by using 10% acrylamide gels and then the proteins were transferred onto nitrocellulose membrane (Amersham Protran, GE Healthcare Life Sciences). After incubation in 5% nonfat dry milk in Tris-buffered saline containing Tween (TBS-T; 200 mM Tris, 0.15 M NaCl (TBS), 0.1% Tween 20, pH 7.3) membranes were incubated with specific primary antibodies overnight. After washing in TBS-T, the membranes were blotted with secondary antibodies (IR dye 680- or IR dye 800- conjugated). Detection was carried out by the Odyssey infrared imaging system (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA). For PTMs of tubulin studies, the integrated area of each band was quantified by densitometry analysis using the ImageJ software (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA, http://imagej.nih.gov/ij/). The ratio of acetylated, tyrosinated or detyrosinated versus  $\beta$ -tubulin or tyrosinated tubulin as indicated in the figures was then calculated for each sample. Data was normalized to the acetylated/tyrosinated or  $\beta$ -tubulin ratio value obtained from Sp<sup>+/+</sup> or Sp<sup> $\Delta/\Delta$ </sup> untreated cortical neurons examined on the same experimental day.

### 2.6. Time-lapse imaging and tracking analysis

Neurons were transfected between 4-DIV and 6-DIV by using 1.5  $\mu$ g of selected cDNA and 3 µL of Lipofectamine2000 (Life technologies) according to manufacturer's instructions. Medium was replaced after 3 h by astrocyte-conditioned Neurobasal completed medium to reduce the toxicity of Lipofectamine2000. After sufficient resting, neurons were treated or not with drugs as described above. Time-lapse experiments were performed between 16 and 24 h after transfection using an inverted microscope Nikon Eclipse Ti equipped with Intensilight C-HGFI fiber source, a 60 ×/1.4 NA Plan-Apochromat oil-immersion Nikon objective, a  $1.6 \times$  tube lens and a Neo-sCMOS digital camera (ANDOR, Belfast, Northern Ireland). Neurons were imaged every 1 s over a time period of 3 min for FP tagged-v-SNARE vesicles or EGFP-EB3 and every 5 s over a time period of minimum 5 min for Mitotracker Orange. Imaging was conducted in modified Krebs-Ringer-HEPES buffer (135 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1.2 mM MgCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub> 20 mM HEPES, 11.1 mM glucose and pH 7.4). Temperature was controlled by warmed air (37 °C). The power source and exposure time were the lowest possible to avoid phototoxicity. FP tagged-v-SNARE vesicles, microtubule plus-ends or mitotracker were tracked within the proximal region of the longest neurite (i.e. the axon) for an average length of 100 µm by kymograph plugins of the Metamorph software (Roper Scientific). Speed and direction of v-SNARE vesicles, mitochondria and microtubule plus-ends were quantified by measuring the slope of the projection of the maximum intensity of fluorescence over the time obtained by kymograph while their number was measured manually. Run length of the individual moving object was calculated by measuring its displacement (over 5 µm) between two pauses. Selected videos were also analyzed with the Manual Tracking plugin, available on the ImageJ website (http:// rsb.info.nih.gov/ij/plugins/track/track.html). Data were collected from 3 to 8 different neuronal cultures obtained from different  $Sp^{+/+}$  or  $Sp^{\Delta/\Delta}$  embryos. Number of neurons analyzed (N) and number of objects tracked (n) are indicated in the figures. Statistical significance was determined by using GraphPad PRISM software.

## 3. Results

To study the role of spastin in microtubule dynamics and axonal membrane traffic, we used cortical neurons from homozygous SPG4 mice (Sp<sup> $\Delta/\Delta$ </sup>; Fig. S1 for characterization) which show strong pathological phenotype compared to heterozygous mice [12,27]. Neurons were cultured between 5 and 7 days in vitro (DIV), thus after the onset of axonal swelling [27].

### 3.1. Tubulin acetylation is increased in SPG4-KO neurons

We first analyzed whether or not the levels of PTMs of tubulin, particularly acetylation, were modified in the present SPG4 mutant neuronal model. As shown in Fig. 1A, western blot analysis showed that the levels of acetylated tubulin were slightly increased in 7-DIV Sp $^{\Delta/\Delta}$ neurons compared to control neurons  $(Sp^{+/+})$  whereas the levels of total  $\beta$ -tubulin or that of tyrosinated tubulin, a marker of dynamic microtubules, were not significant affected (see also Figs. S2A-B). To evaluate and quantify the degree of tubulin acetylation observed in Sp<sup> $\Delta/\Delta$ </sup> neurons, we treated Sp<sup>+/+</sup> neurons with the deacetylase inhibitor trichostatin A (TSA) which increases the level of acetylated tubulin in neurons (Fig. 1B) [46-48] and measured the ratio of both acetylated versus  $\beta$ -tubulin and tyrosinated tubulin by western blotting. The acetylated/ $\beta$ -tubulin ratio was increased by 22.4  $\pm$  2.3% in Sp<sup> $\Delta/\Delta$ </sup> compared to Sp<sup>+/+</sup> neurons and by  $39.4 \pm 6.9\%$  and  $38 \pm 1.4\%$  in Sp<sup>+/+</sup> neurons treated with 100 nM or 500 nM TSA respectively (Fig. 1C). Similarly, the acetylated/tyrosinated ratio was increased by 20.1  $\pm$  3.2% in Sp<sup> $\Delta/\Delta$ </sup> compared to Sp<sup>+/+</sup> neurons and by 42.3  $\pm$  7.2% and 50.7  $\pm$  13.7% in Sp<sup>+/+</sup> neurons treated with 100 nM or 500 nM TSA (Fig. 1D). To confirm the results obtained by WB, we quantified the integrated intensity of acetylated versus tyrosinated tubulin staining within the axons (Fig. 1E-F). Strikingly, we observed a similar and significant increase of this index by 27.0  $\pm$  5% in Sp<sup> $\Delta/\Delta$ </sup> neurons compared to control. On the other hand, TSA induced an increase of 44.0  $\pm$  12% and 60  $\pm$  9% respectively at 100 nM and 500 nM. We next investigated the effects of  $Sp^{\Delta/\Delta}$  on others PTMs of tubulin known to be associated with stable microtubules such as detyrosination and polyglutamylation. We did not observe any significant changes in the levels of these PTMs in  $Sp^{\Delta/\Delta}$  neurons (Fig. S2) confirming previous results [26,27]. Particularly, the detyrosinated to tyrosinated tubulin ratio appeared similar in  $Sp^{\Delta/\Delta}$  and control neurons. Finally, we found no effect of the lack of spastin on the expression level of proteins implicated in the dynamic of the microtubule network such as p60 katanin and stathmin, which were found altered in other spastin mutated cell models [26,49] or of other proteins such as the molecular motor Kif5B and β-tubulin isotype III both implicated in the regulation of microtubule dynamics [50,51] (Fig. S3).

Taken together these results demonstrate a specific imbalanced regulation of the extent of tubulin acetylation likely associated with an increase of microtubule stability within the axon in  $Sp^{\Delta/\Delta}$  neurons.

# 3.2. The anterograde velocity of VAMP7, but not that of VAMP2, -containing vesicles is increased in SPG4-KO neurons

Increased acetylation levels of  $\alpha$ -tubulin have been reported to enhance the recruitment and motility of the molecular motors of both the kinesin-1 subfamily and dynein which drive cargoes along the microtubule networks respectively in anterograde and retrograde direction [46,52–54]. In order to explore the role of spastin on axonal transport we analyzed the motility of two similar but distinct membrane compartments identified by the v-SNAREs, VAMP7 and VAMP2 [55]. Unlike VAMP7, VAMP2 (also named Syb2), the main v-SNARE of mature synaptic vesicles, does not seem to be directly involved in axonal extension [56,57] and it is also transported into the growth cones in neurons [58]. Interesting, VAMP7 and VAMP2 vesicles seem to be driven by two different families of kinesin motors, respectively the kinesin-1 Kif5A [40] and the kinesin-3 Kif1A [59]. We also analyzed the axonal transport of mitochondria whose velocities are not altered in other SPG4-HSP neuronal models.



**Fig. 1.** Acetylated tubulin is increased in  $Sp^{\Delta/\Delta}$  neurons. A, Representative immunoblot analysis for acetylated, tyrosinated and  $\beta$ -tubulin performed on proteins extracted from five different  $Sp^{+/+}$  and  $Sp^{\Delta/\Delta}$  neuronal cultures at DIV7.Note that for acetylated and tyrosinated tubulin the signals come from the same area of the same membrane (overlay). B, Representative immunoblot of proteins from  $Sp^{+/+}$  cultured neurons treated with 100 nM or 500 nM TSA for 4 h. Quantification of the acetylated/ $\beta$ -tubulin (C) and acetylated/tyrosinated tubulin ratio (D) based on the integrated fluorescence intensity of the respective WB bands and normalized for the value measured in control  $Sp^{+/+}$  cells. Each point represents different embryos. E,  $Sp^{\Delta/\Delta}$  and  $Sp^{+/+}$  cortical neurons at 4-DIV were fixed and co-labelled for acetylated and tyrosinated tubulin.  $Sp^{+/+}$  cortical neurons were also treated with 100 nM (not shown) or 500 nM TSA for 4 h to reproduce the treatment applied for immunoblot analyses. F, Quantification of the acetylated/tyrosinated tubulin ratio within the axon. The integrated fluorescence intensity of the longest neurite (i.e. axon) from cell body to the growth cone and the acetylated/tyrosinated tubulin ratio was calculated and normalized to the value obtained in  $Sp^{+/+}$  untreated neurons. Data are shown as mean  $\pm$  SEM. Significance was determined by one-way ANOVA, Dunnett's posttest. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*p < 0.005, \*\*\*\*p < 0.001. ns, not significant. Scale bars, 20 µm.

The dynamics of VAMP7 or VAMP2 vesicles were followed live in cortical neurons after transfection of respectively RFP-tagged VAMP7 (Fig. 2A and Movie S1) and GFP-tagged VAMP2 (Fig. 3A and Movie S2), as previously described [40,43,44]. The mean (kymograph analy-

sis) or the maximum (manual tracking, not shown) anterograde and retrograde velocities were then measured within the axon.

Quantification of VAMP7-vesicles velocities showed that in Sp<sup> $\Delta/\Delta$ </sup> neurons, the anterograde speed was significantly higher than in Sp<sup>+/+</sup> neurons (Fig. 2B and Table 1) whereas the retrograde velocity



**Fig. 2.** The anterograde velocity of VAMP7-vesicles is increased in Sp<sup> $\Delta/\Delta$ </sup> neurons. A, Cortical neurons derived from control (Sp<sup>+/+</sup>) and spastin knock-out (Sp<sup> $\Delta/\Delta$ </sup>) mice were transfected at DIV4 with RFP-VAMP7. Neurons were also treated or not with 500 nM TSA for 4 h. The dynamics of VAMP7-vesicles within the axon was analyzed 16 h after transfection and their speed and directionality were quantified by kymograph (A). Arrow dot lines indicate the regions analyzed to build the kymograph showed below the microphotograph and the orientation of the axon from the cell body to the periphery. B–C, Quantification of the anterograde and retrograde velocity of VAMP7-vesicles. D, Quantification VAMP7 vesicles anterograde and retrograde run length (distance between two pauses over 5 µm) in Sp<sup>+/+</sup> and Sp<sup> $\Delta/\Delta$ </sup> untreated and TSA treated neurons. E, Proportion between VAMP7 transport events in the anterograde and retrograde direction. N and n, number of axons and VAMP7-vesicles respectively analyzed in the panels B-E. Data are shown as mean ± SEM. Significance is determined by one-way ANOVA, Dunnett's posttest. \*p < 0.05; \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.005; ns, not significant. Scale bars, 20 µm.

of such vesicles was not affected (Fig. 2C). In order to investigate whether higher level of acetylated tubulin may by itself enhance the anterograde motility of VAMP7-positive vesicles, we treated Sp<sup>+/+</sup> and Sp<sup> $\Delta/\Delta$ </sup> neurons with 500 nM TSA as described above. Interestingly, we

found an increased VAMP7 anterograde velocity in TSA-treated Sp^{+/+} neurons (Fig. 2B) similar to what we observed in the absence of spastin (0.99  $\pm$  0.04  $\mu m/s$  and 0.95  $\pm$  0.05  $\mu m/s$  respectively for untreated Sp^{\Delta/\Delta} and TSA treated Sp^{+/+} neurons, see also Table 1). Even



Fig. 3. Spastin does not regulate the anterograde velocity of VAMP2 vesicles. A, Cortical neurons derived from control ( $Sp^{+/+}$ ) and spastin knock-out ( $Sp^{\Delta/\Delta}$ ) mice were transfected at DIV4 with GFP-VAMP2. Neurons were also treated or not with 500 nM TSA for 4 h. The dynamics of VAMP2-vesicles within the axon was analyzed 16 h after transfection and their speed and directionality were quantified by kymograph (A). Arrow dot lines indicate the regions analyzed to build the kymograph showed below the microphotograph and the orientation of the axon from the cell body to the periphery. B–C, Quantification of the anterograde and retrograde velocity of VAMP2-vesicles. D, Proportion between VAMP2 transport events in the anterograde and retrograde direction. N and n, number of axons and VAMP2-vesicles respectively analyzed in the panels B–D. Data are shown as mean  $\pm$  SEM. Significance is determined by one-way ANOVA, Dunnett's posttest. \*p < 0.05; ns, not significant. Scale bars, 20 µm.

### Table 1

VAMP7 mean velocities and run length. Data are shown as mean  $\pm$  SEM.

	VAMP7 mean velocity (µm/s)				VAMP7 mean run length (µm)			
	Anterograde		Retrograde		Anterograde		Retrograde	
	Sp <sup>+/+</sup>	$\mathrm{Sp}^{\Delta/\Delta}$	Sp <sup>+/+</sup>	$Sp^{\Delta/\Delta}$	Sp <sup>+/+</sup>	$Sp^{\Delta/\Delta}$	Sp <sup>+/+</sup>	$Sp^{\Delta/\Delta}$
Untreated TSA 500 nM Taxol 10 nM Nocodazole 100 nM	$\begin{array}{c} 0.77 \pm 0.04 \\ 0.95 \pm 0.05 \\ 0.98 \pm 0.06 \\ 0.87 \pm 0.11 \end{array}$	$\begin{array}{c} 0.99 \pm 0.04 \\ 0.91 \pm 0.07 \\ 1.00 \pm 0.05 \\ 0.96 \pm 0.07 \end{array}$	$\begin{array}{c} 0.63 \pm 0.02 \\ 0.75 \pm 0.02 \\ 0.83 \pm 0.04 \\ 0.64 \pm 0.04 \end{array}$	$\begin{array}{c} 0.65 \pm 0.02 \\ 0.71 \pm 0.03 \\ 0.78 \pm 0.03 \\ 0.67 \pm 0.02 \end{array}$	$14.2 \pm 0.8 \\ 17.1 \pm 1.3 \\ 15.2 \pm 1.4 \\ 14.7 \pm 2.7$	$\begin{array}{c} 19.3 \pm 1.3 \\ 18.0 \pm 1.4 \\ 13.8 \pm 1.1 \\ 19.0 \pm 1.7 \end{array}$	$\begin{array}{c} 10.0 \pm 0.3 \\ 11.8 \pm 0.4 \\ 13.2 \pm 0.7 \\ 10.3 \pm 0.8 \end{array}$	$\begin{array}{c} 10.8 \pm 0.4 \\ 11.1 \pm 0.6 \\ 12.3 \pm 0.6 \\ 11.0 \pm 0.4 \end{array}$

though TSA induces an increase of the acetylated to tyrosinated tubulin ratio higher than what is observed in Sp<sup> $\Delta/\Delta$ </sup> neurons (2 fold, Fig. 1), this did not result in an additive effect on VAMP7 anterograde speed in Sp<sup> $\Delta/\Delta$ </sup> neurons (0.91 ± 0.07 µm/s for Sp<sup> $\Delta/\Delta$ </sup> neurons treated with 500 nM TSA). On the other hand, TSA enhanced retrograde velocity of VAMP7-vesicles (Fig. 2C) compared to Sp<sup>+/+</sup> and Sp<sup> $\Delta/\Delta$ </sup> untreated neurons (0.63 ± 0.02 µm/s, 0.65 ± 0.02 µm/s for Sp<sup>+/+</sup> and Sp<sup> $\Delta/\Delta$ </sup> untreated neurons and 0.75 ± 0.02 µm/s, 0.71 ± 0.03 µm/s for Sp<sup>+/+</sup> and Sp<sup> $\Delta/\Delta$ </sup> neurons treated with 500 nM TSA, see also Table 1). The mean run length (up to 5 µm, measured between two pauses) of anterograde, but not retrograde, VAMP7 vesicles was also increased in Sp<sup> $\Delta/\Delta$ </sup> neurons and TSA affected this parameter in a similar way as what it does for velocities (Fig. 2D). Finally, we did not find any significant difference in directionality (anterograde versus retrograde) of VAMP7 vesicles between control and Sp<sup> $\Delta/\Delta$ </sup> neurons both untreated or treated with TSA (Fig. 2E).

On the contrary both the anterograde and retrograde velocity of VAMP2 containing vesicles (Fig. 3 and Movie S2) were not altered in Sp<sup> $\Delta/\Delta$ </sup> neurons compare to control neurons (anterograde, 0.42 ± 0.03 µm/s vs 0.4 ± 0.04 µm/s and retrograde, 0.39 ± 0.02 µm/s vs 0.43 ± 0.03 µm/s, respectively in control and Sp<sup> $\Delta/\Delta$ </sup> neurons). TSA treatment did not upregulate their anterograde velocity (Fig. 3B;

 $0.42\pm0.03~\mu\text{m/s}$  and  $0.38\pm0.03~\mu\text{m/s}$ , respectively in control and Sp^{\Delta/\Delta}TSA-treated neurons) but again induces a significant increase of their retrograde velocity (Fig. 3C;  $0.5\pm0.04~\mu\text{m/s}$  and  $0.51\pm0.03~\mu\text{m/s}$  s, respectively in control and Sp^{\Delta/\Delta} TSA-treated neurons) similar to what observed for VAMP7 vesicles. Both the lack of spastin activity and TSA treatment did not influence significantly the proportion of VAMP2 vesicles moving in anterograde or retrograde direction (Fig. 3D).

Finally we analyzed mitochondrial traffic by tracking mitochondria labelled with Mitotracker in Sp<sup>+/+</sup> and Sp<sup> $\Delta/\Delta$ </sup> neurons (Fig. S4A and Movie S3). Mitochondria mean velocities (excluding pauses) were not significantly different in Sp<sup>+/+</sup> and Sp<sup> $\Delta/\Delta$ </sup> neurons treated or not with TSA (Fig. S4B–C). We did not observe differences in the total amount of actively transported mitochondria between Sp<sup> $\Delta/\Delta$ </sup> and control neurons but we measured an imbalance, even though not significant, between anterograde and retrograde transport events in neurons (Fig. S4D).

These data show that VAMP7 anterograde transport, but not that of VAMP2 vesicles, is enhanced in a similar manner by SPG4-KO and TSA. In addition, TSA treatment induces an increase of retrograde velocity of both VAMP7 and VAMP2 vesicles. Mitochondria velocities seemed not to be affected by both spastin depletion and low doses of TSA in agreement with previous reports [22,25,26,60].

# 3.3. Effects of MTA on microtubule dynamics and VAMP7 membrane traffic in Sp<sup> $\Delta/\Delta$ </sup> cortical neurons

Axonal swelling is the main histological hallmark of *SPAST*-HSP [21,22,27]. This morphological feature is likely caused by a deregulation of fast axonal transport [61–63]. Interestingly, MTA such as taxol and nocodazole at nanomolar concentration prevent/rescue axonal swelling in neurons from Sp<sup> $\Delta/\Delta$ </sup> mice [12]. In order to investigate whether the MTA-dependent recovery of the normal phenotype of Sp<sup> $\Delta/\Delta$ </sup> neurons may be related to a modification of VAMP7 vesicles' traffic, we treated neurons with taxol or nocodazole at doses previously shown to rescue the pathological phenotype in Sp<sup> $\Delta/\Delta$ </sup> neurons [12].

# 3.3.1. MTAs affect similarly the morphology and the PTMs of tubulin in $Sp^{\Delta/\Delta}$ and control neurons

Although, when used at substoichiometric concentrations these drugs alter the dynamic instability of microtubules without a significant impact on microtubule mass [64-66], different studies in isolated neurons demonstrated that they induce significant changes at the morphological level [47,48] and on PTMs of tubulin, including acetylation [47,48,67]. Thus, we first analyzed whether these drugs affect in different manner these features in  $Sp^{\Delta/\Delta}$  and control neurons. As shown in Fig. 4A we confirmed that 10 nM taxol and 100 nM nocodazole drastically reduced the number of active microtubule plus-ends both in  $Sp^{\Delta/\Delta}$  and control neurons (not shown) in agreement with a reduction of microtubule dynamics. Nocodazole completely abolished the active microtubule plus-end [68,69] while after taxol treatment they appeared less abundant, shorter and tend to accumulate in the distal part of neurites [48,70]. Live imaging analysis of EB3-GFP, a plus-end marker of microtubule [68], in Sp<sup>+/+</sup> and Sp<sup> $\Delta/\Delta$ </sup> neurons treated or not with the drugs confirmed that taxol did not completely abolish active microtubule plus-ends (Fig. S5 and Movie S4). Quantification of the speed of EB3-GFP comets along the axon did not reveal differences in the polymerization rate in  $Sp^{+/+}$  and  $Sp^{\Delta/\Delta}$  neurons treated or not with taxol [12,70] (Fig. S5B). Confirming immunofluorescence experiments, EB3 lifetime was reduced by taxol treatment (Fig. S5C). Then we showed (Fig. 4B-C) that most taxol-treated (10 nM) neurons have straighter long neurites characterized by fewer branches [48] whereas nocodazole-treated neurons (100 nM) developed just one or two long

processes with a strong reduction of minor neurites [48] associated with an important disorganization of the microtubule network particularly revealed by tyrosinated tubulin staining. The effects of taxol and nocodazole are dose-dependent (Figs. S6 and S7). Finally we analyzed the effects of these drugs on the level of PTMs of tubulin. As expected, taxol-treated neurons showed high ratio of acetylated versus tyrosinated microtubules within the axon both in Sp<sup>+/+</sup> and Sp<sup> $\Delta/\Delta$ </sup> neurons (Fig. 4D). Interestingly, this index was also significantly increased in nocodazole-treated neurons. WB analysis (Fig. 4E-G) revealed that taxol significantly increased acetylated tubulin (by 32.3  $\pm$  8.3% and 15.5  $\pm$  4.4% in taxol-treated Sp^{+/+} and Sp^{\Delta/\Delta} neurons respectively; Fig. 4G) and strongly reduced the amount of tyrosinated tubulin [71] which resulted in a high acetylated to tyrosinated tubulin ratio. Nocodazole-treated neurons showed also an increase of this index likely due to the depolymerization of the dynamic-tyrosinated microtubules. In agreement with previous observations the microtubule mass was not altered by these drugs (Fig. 4E, β-tubulin).

These results demonstrate that the effects of taxol or nocodazole on microtubule dynamics, neuronal morphology and the level of PTMs of tubulin are not significant different between control and Sp<sup> $\Delta/\Delta$ </sup> neurons.

# 3.3.2. MTA did not restore altered VAMP7 anterograde speed to basal level

We then examined whether these drugs alter the transport of VAMP7 vesicles in Sp<sup> $\Delta/\Delta$ </sup> and control neurons. Taxol significantly increased the anterograde mean speed of VAMP7 vesicles in Sp<sup>+/+</sup> neurons up to a level close to what is measured in untreated Sp<sup> $\Delta/\Delta$ </sup> neurons but it did not modify this velocity when added in Sp<sup> $\Delta/\Delta$ </sup> neurons (Fig. 5A and Table 1). On the other hand, taxol increased the VAMP7 retrograde mean speed both in Sp<sup>+/+</sup> and Sp<sup> $\Delta/\Delta$ </sup> neurons (0.83 ± 0.04 µm/s versus 0.79 ± 0.03 µm/s for Sp<sup>+/+</sup> and Sp<sup> $\Delta/\Delta$ </sup> neurons respectively; Fig. 5B and Table 1). On the contrary, nocodazole did not affect VAMP7 anterograde or retrograde velocities. Run length showed a similar profile than velocities with the exception of taxol treatment which did not increase this parameter in Sp<sup>+/+</sup> neurons and reduced it in Sp<sup> $\Delta/\Delta$ </sup> neurons (Fig. 5C–D). Again, these drugs did not modify the proportion of VAMP7 vesicles moving in anterograde or retrograde direction (Fig. 5E and see also Fig. 2E).

Taken together these data suggest that nocodazole and taxol did not restore the altered anterograde axonal transport of VAMP7 vesicles observed in Sp<sup> $\Delta/\Delta$ </sup> cortical neurons. However taxol increases VAMP7 retrograde velocity similar to TSA treatment.

#### 4. Discussion

Despite a documented implication of spastin in the regulation of microtubule dynamics, its role on microtubule-based membrane axonal transport is not well established so far. Moreover, previous studies in spastin deficient neuronal models failed to find any correlation between an increased level of acetylated tubulin, generally associated with a reduced activity of spastin, and the dynamics of axonal membrane cargoes.

# 4.1. The level of acetylated tubulin, but no that of other PTMs of tubulin, is increased in SPG4-KO neurons

In the Sp<sup> $\Delta/\Delta$ </sup> neuronal model used here, we showed that the acetylation level of tubulin was slightly but significant increased compared to control neurons in agreement with previous observation in others SPG4-HSP neuronal model [19,21,22]. This effect seems to be restricted to acetylation since we neither observe the alteration of others PTMs of tubulin such as tyrosination, de-tyrosination and polyglutamylation (Fig. S2) nor changing in the expression of others proteins impli-



Fig. 4. Effect of MTA on microtubule dynamics, neuronal morphology and the levels of PTMs of tubulin in cortical neurons. A,  $Sp^{\Delta/\Delta}$  cortical neurons were treated or not with 10 nM taxol or 100 nM Nocodazole for 14–16 h, fixed and labelled for the microtubule plus-ends marker EB1 (arrowheads). Nocodazole completely abolished the active microtubule plus-end while taxol did not. Control (B) and  $Sp^{\Delta/\Delta}$  (C) cortical neurons were treated or not with 10 nM taxol or 100 nM Nocodazole for 14–16 h, fixed and stained for acetylated and tyrosinated tubulin. D, Quantification of the acetylated/tyrosinated tubulin ratio within the axon. The integrated fluorescence intensity of the two PTMs of tubulin was measured within the longest neurite (i.e. axon) from cell body to the growth cone and the acetylated/tyrosinated tubulin ratio was calculated and normalized to the value obtained in  $Sp^{+/+}$  or  $Sp^{\Delta/\Delta}$  untreated neurons. Data are shown as mean  $\pm$  SEM. Significance was determined by one-way ANOVA, Dunnett's posttest. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*\*p < 0.001. E, Representative Immunoblot of

proteins from 7-DIV cultured neurons treated with the drugs. Quantification of the acetylated versus tyrosinated (F) or  $\beta$ -tubulin (G) ratio based on the integrated fluorescence intensity of the respective WB bands and normalized for the value measured in Sp<sup>+/+</sup> or Sp<sup> $\Delta/\Delta$ </sup> untreated cells. Data are shown as mean  $\pm$  SD. Scale bars, 20  $\mu$ m.



**Fig. 5.** Taxol increases retrograde velocity of VAMP7 vesicles in Sp<sup> $\Delta/\Delta$ </sup> neurons. Sp<sup>+/+</sup> and Sp<sup> $\Delta/\Delta$ </sup> cortical neurons were transfected with RFP-VAMP7 and then treated or not with 10 nM taxol or 100 nM Nocodazole for 14-16 h. Dynamics of moving VAMP7-vesicles within the axon was analyzed 16 h after transfection and their speed and directionality were quantified by kymograph as shown in Fig. 2. A–B, Quantification of anterograde (A) or retrograde (B) velocity of VAMP7 moving vesicles within the axon treated or not with the drugs. C, Quantification of run length (distance between two pauses over 5 µm) of anterograde and retrograde moving VAMP7 vesicles in Sp<sup>+/+</sup> and Sp<sup> $\Delta/\Delta$ </sup> untreated and drugs-treated neurons. D, Proportion of VAMP7 transport events in anterograde or retrograde direction in drugs treated neurons. N and n, number of axons and VAMP7-vesicles respectively analyzed in the panels A–E. Data are shown as mean  $\pm$  SEM. Significance is determined by one-way ANOVA, Dunnett's posttest. \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.005;\*\*\*\*p < 0.001. ns, not significant.

cated in microtubule dynamics (Fig. S3). Tarrade and coworkers suggested that de-tyrosinated tubulin is enriched in axonal swelling but they did not observe a general increase of this PTM as in this work [27]. Thus, an increased level of acetylated tubulin may represent a specific response to a reduced or a lacked activity of spastin in neurons. Indeed, theoretically, a lower concentration of spastin results in longer microtubules which should be a better substrate for the slow catalytic activity of the  $\alpha$ -tubulin acetyl transferase (TAT) [72,73]. Given the importance of spastin in several neuronal processes such as branch formation [16], alternative molecular mechanisms can compensate for the lack of expression of this protein. Interesting, the activity of katanin, the other microtubules severing protein highly expressed in the CNS [74], is regulated by the acetylation state of microtubules [75]. Therefore the increased level of acetylation observed in  $Sp^{\Delta/\Delta}$  cortical neurons may enhance the severing activity of katanin without necessarily requiring an increase in its expression (Fig. S3).

# 4.2. Selective regulation of the VAMP7 anterograde velocity in Sp^{\Delta/\Delta} neurons

It is worth noting that microtubule-dependent motor proteins show a higher affinity towards stable microtubules [47,52,76]. Particularly, an increased acetylation levels of  $\alpha$ -tubulin enhances the motility and the recruitment of both kinesin-1 and dynein to microtubules

[46,52–54] which is in line with an augmented vesicle transport on stable microtubules. Previous studies on the axonal transport of mitochondria demonstrated that only their motility was altered while the velocities were unchanged suggesting that the activity of the molecular motors was unaffected by a reduction of spastin activity [22,25,26]. Indeed, in the present  $Sp^{\Delta/\Delta}$  neuronal model, we confirm that mitochondria velocities are unaffected (Fig. S4) but we found that the anterograde velocity of VAMP7 vesicles was significantly increased in agreement with an enhanced activity of kinesin motors. Due to the abovementioned effects of acetylation on motors, we think that this later effect likely depends on the increased level of acetylated tubulin observed in  $Sp^{\Delta/\Delta}$  neurons. Low doses of drugs such as TSA and taxol which by different mechanisms increase the proportion of acetylated stable versus dynamic microtubules [46-48] enhance the anterograde velocity of VAMP7 vesicles to an extent similar to what was observed in  $Sp^{\Delta/\Delta}$  neurons. This again fits well with an augmented activity of kinesin motors in both  $Sp^{\Delta/\Delta}$  and drugs-treated neurons. On the contrary, the anterograde velocity of vesicles containing the v-SNARE VAMP2 is unchanged in  $Sp^{\Delta/\Delta}$  and TSA treated neurons, suggesting that only the transport of specific axonal cargoes is altered by a reduction of spastin activity. An easy explanation of these results is that VAMP7 and VAMP2 vesicles are likely travelled along microtubules by two different classes of kinesin motors, respectively the kinesin-1 Kif5A [40] and the kinesin-3 Kif1A [59]. Indeed, only the members of kinesin-1 family associate preferentially with PTM-marked microtubules in cells, particularly acetylation, whereas kinesin-3 motors show no selectivity for PTM-marked tracks [53]. However, this conclusion is likely too simplistic since the transport of other axonal cargoes driven at least by a kinesin-1 motor such as mitochondria [77,78] and APP vesicles [79,80] are not affected in the same manner in spastin defective neurons [22,25,26]. Other parameters such as the size of the cargo, the number of motor engaged and probably the presence of specific adaptor proteins [81–83] may have an important role in the outcome of axonal cargo transport due to the SPG4 reduced activity.

# 4.3. Higher increase of tubulin acetylation enhances the activity of dynein motor

In TSA-treated neurons we observed also an increase of the retrograde velocity of both VAMP7 and VAMP2 vesicles which suggest an increased activity of dynein motors. This effect correlates with the higher increase of tubulin acetylation induced by this drug compare to that observed in Sp $^{\Delta/\Delta}$  neurons (Fig. 1). TSA-induced tubulin acetylation has been already shown to enhance the velocities both in anterograde and retrograde direction of the BDNF-containing vesicles in neurons [46]. In cells the mechanism by which the molecular motors are recruited and activated by tubulin acetylation is not fully understood. In vitro experiments [84,85] suggest that additional in vivo mechanisms depending on tubulin acetylation, such as the binding to microtubules of specific MAPs [86] or structural changes that occur in the microtubule lattice, enhance the affinity of molecular motors for microtubule tracks and their motility. The most likely scenario is that the magnitude of tubulin acetylation may affect differently these or other unknown parameters and only higher level of tubulin acetylation significantly enhances the interaction and the activity of dynein motor and/or its adaptor proteins to microtubules.

### 4.4. Altered anterograde transport is not restored to basal level by MTA

Axonal swelling is a feature of a variety of motor neuron diseases in humans and other vertebrates [87,88] including SPAST-HSP [21,22,27]. These pathological structures are likely caused by a deregulation of fast axonal transport and are often filled with several axonal cargoes including vesicles, synaptic membrane proteins and mitochondria [61-63]. MTA hold promise as potential therapeutic treatments for several neurodegenerative diseases [89,90] and, interestingly, drugs such as taxol and nocodazole used at nanomolar concentration prevent/rescue axonal swelling in cortical neurons from  $Sp^{\Delta/\Delta}$  mice [12]. However to date, the molecular and cellular mechanisms by which these drugs rescue the normal phenotype of  $Sp^{\Delta/\Delta}$  neurons are not fully understood. In this work we show that taxol and nocodazole did not rescue the altered anterograde velocity of VAMP7-vesicles observed in Sp<sup> $\Delta/\Delta$ </sup> neurons (Fig. 5). However, VAMP7 vesicles retrograde velocity was increased by taxol, but not nocodazole, in control and Sp<sup> $\Delta/\Delta$ </sup> neurons, similarly to what observed with TSA (see Table 1) and in correlation with the increased level of acetylated tubulin of taxol-treated neurons (Fig. 4D-G). Although a direct link between axonal swelling formation and perturbation of axonal traffic has not been clearly established so far, the present results suggest that MTA may rescue axonal swelling in SPG4-KO model not simply by returning the membrane traffic properties to basal level but rather that taxol, and likely other drugs that increase acetylated tubulin, may counterbalance the altered anterograde traffic by increasing the retrograde velocity of axonal cargoes, as it is the case for VAMP7 vesicles.

#### 4.5. Conclusion

In conclusion, these and previous results are consistent with a model (Fig. 6) in which the absence or the reduced expression of spastin likely results in longer and locally disorganized microtubule arrays within the axons [12,26]. This pathological condition leads to an increased level of acetylated tubulin which enhances, directly or indirectly, the anterograde speed of small axonal cargoes driven by kinesin-1 motors such as VAMP7 vesicles. The consequent deregulation of axonal transport might induce axonal defect such as axonal swelling. Our results could not definitively state whether VAMP7 is directly involved in the SPG4-linked disease and this assumption likely requires further investigation. However, the fact that the dynamics of VAMP2 vesicles and mitochondria are not affected in SPG4-KO neurons strongly suggests that an altered transport of VAMP7-positive compartment may trigger the onset and/or progression of the SPG4-linked neurodegeneration. Indeed, a fine regulation of VAMP7 transport, whose role is pivotal to support plasma membrane expansion and remodeling during neuronal development [32,33,40], is surely needed to maintain the stability and viability of the longest neurons of the CNS.

Supplementary data to this article can be found online at http://dx. doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.04.007.

## Authors' contributions

CP and MM performed some time lapse video imaging and WB experiments. VJ performed genotyping analysis and some WB experiments. AB performed and analyzed all the others experiments, inter-



# Sp $\Delta/\Delta$ and drug-induced tubulin acetylation



**Fig. 6.** A proposed model to account for spastin defects and tubulin acetylation in VAMP7 axonal transport. By cleaving microtubules, spastin controls the mean length of microtubules. In pathological conditions, the lower level of functional spastin leads to a lower number of severing events and longer microtubules. This condition is associated with a weak increase of the level of acetylated tubulin which enhances the binding and the activity of the molecular motors of kinesin-1 family resulting in a selective increase of VAMP7 vesicles anterograde velocity. Higher level of tubulin acetylation, induced for example by MTA or inhibitors of HDAC6, increases also retrograde velocity of VAMPs vesicles suggesting an augmented activity of dynein motors.

preted the results and was the major contributor in writing the manuscript. VJ, DP, TG and PC participate to the writing and the critical reading of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

#### **Transparency document**

The Transparency document associated with this article can be found, in online version.

# Acknowledgements

All data generated or analyzed during this study are included in this published article and its supplementary information files. We are grateful to Aurore Pignerol for performing some WB experiments. Animal experiments were performed according to the governmental guidelines no 86/609/CEE. This work was funded by grants from INSERM, University of Evry and the Association Française contre les Myopathies (AFM; Research Programs no 18813). CP was supported by DIM Cerveau et Pensée, Ile de France. The authors declare that they have no competing interests.

#### References

- G.C. Deluca, G.C. Ebers, M.M. Esiri, The extent of axonal loss in the long tracts in hereditary spastic paraplegia, Neuropathol. Appl. Neurobiol. 30 (2004) 576–584.
- [2] G. Novarino, A.G. Fenstermaker, M.S. Zaki, M. Hofree, J.L. Silhavy, A.D. Heiberg, M. Abdellateef, B. Rosti, E. Scott, L. Mansour, A. Masri, H. Kayserili, J.Y. Al-Aama, G.M. Abdel-Salam, A. Karminejad, M. Kara, B. Kara, B. Bozorgmehri, T. Ben-Omran, F. Mojahedi, I.G. Mahmoud, N. Bouslam, A. Bouhouche, A. Benomar, S. Hanein, L. Raymond, S. Forlani, M. Mascaro, L. Selim, N. Shehata, N. Al-Allawi, P.S. Bindu, M. Azam, M. Gunel, A. Caglayan, K. Bilguvar, A. Tolun, M.Y. Issa, J. Schroth, E.G. Spencer, R.O. Rosti, N. Akizu, K.K. Vaux, A. Johansen, A.A. Koh, H. Megahed, A. Durr, A. Brice, G. Stevanin, S.B. Gabriel, T. Ideker, J.G. Gleeson, Exome sequencing links corticospinal motor neuron disease to common neurodegenerative disorders, Science 343 (2014) 506–511.
- [3] J.K. Fink, Hereditary spastic paraplegia: clinico-pathologic features and emerging molecular mechanisms, Acta Neuropathol. 126 (2013) 307–328.
- [4] C. Depienne, G. Stevanin, A. Brice, A. Durr, Hereditary spastic paraplegias: an update, Curr. Opin. Neurol. 20 (2007) 674–680.
- [5] N. Fonknechten, D. Mavel, P. Byrne, C.S. Davoine, C. Cruaud, D. Bonsch, D. Samson, P. Coutinho, M. Hutchinson, P. McMonagle, J.M. Burgunder, A. Tartaglione, O. Heinzlef, I. Feki, T. Deufel, N. Parfrey, A. Brice, B. Fontaine, J.F. Prud'homme, J. Weissenbach, A. Durr, J. Hazan, Spectrum of SPG4 mutations in autosomal dominant spastic paraplegia, Hum. Mol. Genet. 9 (2000) 637–644.
- [6] J. Hazan, N. Fonknechten, D. Mavel, C. Paternotte, D. Samson, F. Artiguenave, C.S. Davoine, C. Cruaud, A. Durr, P. Wincker, P. Brottier, L. Cattolico, V. Barbe, J.M. Burgunder, J.F. Prud'homme, A. Brice, B. Fontaine, B. Heilig, J. Weissenbach, Spastin, a new AAA protein, is altered in the most frequent form of autosomal dominant spastic paraplegia, Nat. Genet. 23 (1999) 296–303.
- [7] J.M. Solowska, P.W. Baas, Hereditary spastic paraplegia SPG4: what is known and not known about the disease, Brain 138 (2015) 2471–2484.
- [8] C. Blackstone, C.J. O'Kane, E. Reid, Hereditary spastic paraplegias: membrane traffic and the motor pathway, Nat. Rev. 12 (2011) 31–42.
- [9] A. Roll-Mecak, R.D. Vale, The Drosophila homologue of the hereditary spastic paraplegia protein, spastin, severs and disassembles microtubules, Curr. Biol. 15 (2005) 650–655.
- [10] A. Roll-Mecak, R.D. Vale, Structural basis of microtubule severing by the hereditary spastic paraplegia protein spastin, Nature 451 (2008) 363–367.
- [11] E. Riano, M. Martignoni, G. Mancuso, D. Cartelli, F. Crippa, I. Toldo, G. Siciliano, D. Di Bella, F. Taroni, M.T. Bassi, G. Cappelletti, E.I. Rugarli, Pleiotropic effects of spastin on neurite growth depending on expression levels, J. Neurochem. 108 (2009) 1277–1288.
- [12] C. Fassier, A. Tarrade, L. Peris, S. Courageot, P. Mailly, C. Dalard, S. Delga, N. Roblot, J. Lefevre, D. Job, J. Hazan, P.A. Curmi, J. Melki, Microtubule-targeting drugs rescue axonal swellings in cortical neurons from spastin knockout mice, Dis. Model. Mech. 6 (2013) 72–83.
- [13] L. Qiang, W. Yu, M. Liu, J.M. Solowska, P.W. Baas, Basic fibroblast growth factor elicits formation of interstitial axonal branches via enhanced severing of microtubules, Mol. Biol. Cell 21 (2010) 334–344.
- [14] R. Butler, J.D. Wood, J.A. Landers, V.T. Cunliffe, Genetic and chemical modulation of spastin-dependent axon outgrowth in zebrafish embryos indicates a role for impaired microtubule dynamics in hereditary spastic paraplegia, Dis. Model. Mech. 3 (2010) 743–751.
- [15] J.H. Lumb, J.W. Connell, R. Allison, E. Reid, The AAA ATPase spastin links microtubule severing to membrane modelling, Biochim. Biophys. Acta 1823 (2012) 192–197.

- [16] W. Yu, L. Qiang, J.M. Solowska, A. Karabay, S. Korulu, P.W. Baas, The microtubule-severing proteins spastin and katanin participate differently in the formation of axonal branches, Mol. Biol. Cell 19 (2008) 1485–1498.
- [17] M.C. Stone, K. Rao, K.W. Gheres, S. Kim, J. Tao, C. La Rochelle, C.T. Folker, N.T. Sherwood, M.M. Rolls, Normal spastin gene dosage is specifically required for axon regeneration, Cell Rep. 2 (2012) 1340–1350.
- [18] N.T. Sherwood, Q. Sun, M. Xue, B. Zhang, K. Zinn, Drosophila spastin regulates synaptic microtubule networks and is required for normal motor function, PLoS Biol. 2 (2004), e429.
- [19] N. Trotta, G. Orso, M.G. Rossetto, A. Daga, K. Broadie, The hereditary spastic paraplegia gene, spastin, regulates microtubule stability to modulate synaptic structure and function, Curr. Biol. 14 (2004) 1135–1147.
- [20] H.T. Tsang, T.L. Edwards, X. Wang, J.W. Connell, R.J. Davies, H.J. Durrington, C.J. O'Kane, J.P. Luzio, E. Reid, The hereditary spastic paraplegia proteins NIPA1, spastin and spartin are inhibitors of mammalian BMP signalling, Hum. Mol. Genet. 18 (2009) 3805–3821.
- [21] G. Orso, A. Martinuzzi, M.G. Rossetto, E. Sartori, M. Feany, A. Daga, Disease-related phenotypes in a Drosophila model of hereditary spastic paraplegia are ameliorated by treatment with vinblastine, J. Clin. Invest. 115 (2005) 3026–3034.
- [22] K.R. Denton, L. Lei, J. Grenier, V. Rodionov, C. Blackstone, X.J. Li, Loss of spastin function results in disease-specific axonal defects in human pluripotent stem cell-based models of hereditary spastic paraplegia, Stem Cells 32 (2014) 414–423.
- [23] Y. Song, S.T. Brady, Post-translational modifications of tubulin: pathways to functional diversity of microtubules, Trends Cell Biol. 25 (2015) 125–136.
- [24] C. Janke, The tubulin code: molecular components, readout mechanisms, and functions, J. Cell Biol. 206 (2014) 461–472.
- [25] P.R. Kasher, K.J. De Vos, S.B. Wharton, C. Manser, E.J. Bennett, M. Bingley, J.D. Wood, R. Milner, C.J. McDermott, C.C. Miller, P.J. Shaw, A.J. Grierson, Direct evidence for axonal transport defects in a novel mouse model of mutant spastin-induced hereditary spastic paraplegia (HSP) and human HSP patients, J. Neurochem. 110 (2009) 34–44.
- [26] S. Havlicek, Z. Kohl, H.K. Mishra, I. Prots, E. Eberhardt, N. Denguir, H. Wend, S. Plotz, L. Boyer, M.C. Marchetto, S. Aigner, H. Sticht, T.W. Groemer, U. Hehr, A. Lampert, U. Schlotzer-Schrehardt, J. Winkler, F.H. Gage, B. Winner, Gene dosage-dependent rescue of HSP neurite defects in SPG4 patients' neurons, Hum. Mol. Genet. (2014).
- [27] A. Tarrade, C. Fassier, S. Courageot, D. Charvin, J. Vitte, L. Peris, A. Thorel, E. Mouisel, N. Fonknechten, N. Roblot, D. Seilhean, A. Dierich, J.J. Hauw, J. Melki, A mutation of spastin is responsible for swellings and impairment of transport in a region of axon characterized by changes in microtubule composition, Hum. Mol. Genet. 15 (2006) 3544–3558.
- [28] R. Jahn, R.H. Scheller, SNAREs engines for membrane fusion, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 7 (2006) 631–643.
- [29] N.A. Ramakrishnan, M.J. Drescher, D.G. Drescher, The SNARE complex in neuronal and sensory cells, Mol. Cell. Neurosci. 50 (2012) 58–69.
- [30] F. Daste, T. Galli, D. Tareste, Structure and function of longin SNAREs, J. Cell Sci. 128 (2015) 4263–4272.
- [31] J.I. Wojnacki Fonseca, T. Galli, Membrane traffic during axon development, Dev. Neurobiol. (2016).
- [32] S.L. Gupton, F.B. Gertler, Integrin signaling switches the cytoskeletal and exocytic machinery that drives neuritogenesis, Dev. Cell 18 (2010) 725–736.
- [33] S. Martinez-Arca, P. Alberts, A. Zahraoui, D. Louvard, T. Galli, Role of tetanus neurotoxin insensitive vesicle-associated membrane protein (TI-VAMP) in vesicular transport mediating neurite outgrowth, J. Cell Biol. 149 (2000) 889–899.
- [34] S. Martinez-Arca, S. Coco, G. Mainguy, U. Schenk, P. Alberts, P. Bouille, M. Mezzina, A. Prochiantz, M. Matteoli, D. Louvard, T. Galli, A common exocytotic mechanism mediates axonal and dendritic outgrowth, J. Neurosci. 21 (2001) 3830–3838.
- [35] P. Alberts, R. Rudge, I. Hinners, A. Muzerelle, S. MartinezArca, T. Irinopoulou, V. Marthiens, S. Tooze, F. Rathjen, P. Gaspar, T. Galli, Cross talk between tetanus neurotoxin-insensitive vesicle- associated membrane protein-mediated transport and L1-mediated adhesion, Mol. Biol. Cell 14 (2003) 4207–4220.
- [36] T. Cotrufo, F. Perez-Branguli, A. Muhaisen, O. Ros, R. Andres, T. Baeriswyl, G. Fuschini, T. Tarrago, M. Pascual, J. Urena, J. Blasi, E. Giralt, E.T. Stoeckli, E. Soriano, A signaling mechanism coupling netrin-1/deleted in colorectal cancer chemoattraction to SNARE-mediated exocytosis in axonal growth cones, J. Neurosci, 31 (2011) 14463–14480.
- [37] Z. Hua, S. Leal-Ortiz, S.M. Foss, C.L. Waites, C.C. Garner, S.M. Voglmaier, R.H. Edwards, v-SNARE composition distinguishes synaptic vesicle pools, Neuron 71 (2011) 474–487.
- [38] A. Scheuber, R. Rudge, L. Danglot, G. Raposo, T. Binz, J.C. Poncer, T. Galli, Loss of AP-3 function affects spontaneous and evoked release at hippocampal mossy fiber synapses, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 103 (2006) 16562–16567.
- [39] L. Danglot, K. Zylbersztejn, M. Petkovic, M. Gauberti, H. Meziane, R. Combe, M.F. Champy, M.C. Birling, G. Pavlovic, J.C. Bizot, F. Trovero, F. Della Ragione, V. Proux-Gillardeaux, T. Sorg, D. Vivien, M. D'Esposito, T. Galli, Absence of TI-VAMP/Vamp7 leads to increased anxiety in mice, J. Neurosci. 32 (2012) 1962–1968.
- [40] A. Burgo, V. Proux-Gillardeaux, E. Sotirakis, P. Bun, A. Casano, A. Verraes, R.K. Liem, E. Formstecher, M. Coppey-Moisan, T. Galli, A molecular network for the transport of the TI-VAMP/VAMP7 vesicles from cell center to periphery, Dev. Cell 23 (2012) 166–180.
- [41] E. Reid, M. Kloos, A. Ashley-Koch, L. Hughes, S. Bevan, I.K. Svenson, F.L. Graham, P.C. Gaskell, A. Dearlove, M.A. Pericak-Vance, D.C. Rubinsztein, D.A. Marchuk, A

#### C. Plaud et al.

kinesin heavy chain (KIF5A) mutation in hereditary spastic paraplegia (SPG10), Am. J. Hum. Genet. 71 (2002) 1189–1194.

- [42] M. Jouet, A. Rosenthal, G. Armstrong, J. MacFarlane, R. Stevenson, J. Paterson, A. Metzenberg, V. Ionasescu, K. Temple, S. Kenwrick, X-linked spastic paraplegia (SPG1), MASA syndrome and X-linked hydrocephalus result from mutations in the L1 gene, Nat. Genet. 7 (1994) 402–407.
- [43] K. Tsaneva-Atanasova, A. Burgo, T. Galli, D. Holcman, Quantifying neurite growth mediated by interactions among secretory vesicles, microtubules, and actin networks, Biophys. J. 96 (2009) 840–857.
- [44] A. Burgo, E. Sotirakis, M.C. Simmler, A. Verraes, C. Chamot, J.C. Simpson, L. Lanzetti, V. Proux-Gillardeaux, T. Galli, Role of Varp, a Rab21 exchange factor and TI-VAMP/VAMP7 partner, in neurite growth, EMBO Rep. 10 (2009) 1117–1124.
- [45] L. Danglot, A. Triller, A. Bessis, Association of gephyrin with synaptic and extrasynaptic GABAA receptors varies during development in cultured hippocampal neurons, Mol. Cell. Neurosci. 23 (2003) 264–278.
- [46] J.P. Dompierre, J.D. Godin, B.C. Charrin, F.P. Cordelieres, S.J. King, S. Humbert, F. Saudou, Histone deacetylase 6 inhibition compensates for the transport deficit in Huntington's disease by increasing tubulin acetylation, J. Neurosci. 27 (2007) 3571–3583.
- [47] J.W. Hammond, C.F. Huang, S. Kaech, C. Jacobson, G. Banker, K.J. Verhey, Posttranslational modifications of tubulin and the polarized transport of kinesin-1 in neurons, Mol. Biol. Cell 21 (2010) 572–583.
- [48] H. Witte, D. Neukirchen, F. Bradke, Microtubule stabilization specifies initial neuronal polarization, J. Cell Biol. 180 (2008) 619–632.
- [49] G. Abrahamsen, Y. Fan, N. Matigian, G. Wali, B. Bellette, R. Sutharsan, J. Raju, S.A. Wood, D. Veivers, C.M. Sue, A. Mackay-Sim, A patient-derived stem cell model of hereditary spastic paraplegia with SPAST mutations, Dis. Model. Mech. 6 (2013) 489–502.
- [50] V. Daire, J. Giustiniani, I. Leroy-Gori, M. Quesnoit, S. Drevensek, A. Dimitrov, F. Perez, C. Pous, Kinesin-1 regulates microtubule dynamics via a c-Jun N-terminal kinase-dependent mechanism, J. Biol. Chem. 284 (2009) 31992–32001.
- [51] D. Panda, H.P. Miller, A. Banerjee, R.F. Luduena, L. Wilson, Microtubule dynamics in vitro are regulated by the tubulin isotype composition, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 91 (1994) 11358–11362.
- [52] N.A. Reed, D. Cai, T.L. Blasius, G.T. Jih, E. Meyhofer, J. Gaertig, K.J. Verhey, Microtubule acetylation promotes kinesin-1 binding and transport, Curr. Biol. 16 (2006) 2166–2172.
- [53] D. Cai, D.P. McEwen, J.R. Martens, E. Meyhofer, K.J. Verhey, Single molecule imaging reveals differences in microtubule track selection between Kinesin motors, PLoS Biol. 7 (2009), e1000216.
- [54] J.D. Alper, F. Decker, B. Agana, J. Howard, The motility of axonemal dynein is regulated by the tubulin code, Biophys. J. 107 (2014) 2872–2880.
- [55] S. Coco, G. Raposo, S. Martinez, J.J. Fontaine, S. Takamori, A. Zahraoui, R. Jahn, M. Matteoli, D. Louvard, T. Galli, Subcellular localization of tetanus neurotoxin-insensitive vesicle-associated membrane protein (VAMP)/VAMP7 in neuronal cells: Evidence for a novel membrane compartment, J. Neurosci. 19 (1999) 9803–9812.
- [56] A. Osen-Sand, J.K. Staple, E. Naldi, G. Schiavo, O. Rossetto, S. Petitpierre, A. Malgaroli, C. Montecucco, S. Catsicas, Common and distinct fusion proteins in axonal growth and transmitter release, J. Comp. Neurol. 367 (1996) 222–234.
- [57] S. Schoch, F. Deak, A. Konigstorfer, M. Mozhayeva, Y. Sara, T.C. Sudhof, E.T. Kavalali, SNARE function analyzed in synaptobrevin/VAMP knockout mice, Science 294 (2001) 1117–1122.
- [58] T. Tojima, H. Akiyama, R. Itofusa, Y. Li, H. Katayama, A. Miyawaki, H. Kamiguchi, Attractive axon guidance involves asymmetric membrane transport and exocytosis in the growth cone, Nat. Neurosci. 10 (2007) 58–66.
- [59] J.S. Liu, C.R. Schubert, X. Fu, F.J. Fourniol, J.K. Jaiswal, A. Houdusse, C.M. Stultz, C.A. Moores, C.A. Walsh, Molecular basis for specific regulation of neuronal kinesin-3 motors by doublecortin family proteins, Mol. Cell 47 (2012) 707–721.
- [60] V.K. Godena, N. Brookes-Hocking, A. Moller, G. Shaw, M. Oswald, R.M. Sancho, C.C. Miller, A.J. Whitworth, K.J. De Vos, Increasing microtubule acetylation rescues axonal transport and locomotor deficits caused by LRRK2 Roc-COR domain mutations, Nat. Commun. 5 (2014) 5245.
- [61] D.D. Hurd, W.M. Saxton, Kinesin mutations cause motor neuron disease phenotypes by disrupting fast axonal transport in Drosophila, Genetics 144 (1996) 1075–1085.
- [62] M. Martin, S.J. Iyadurai, A. Gassman, J.G. Gindhart Jr., T.S. Hays, W.M. Saxton, Cytoplasmic dynein, the dynactin complex, and kinesin are interdependent and essential for fast axonal transport, Mol. Biol. Cell 10 (1999) 3717–3728.
- [63] G.B. Stokin, C. Lillo, T.L. Falzone, R.G. Brusch, E. Rockenstein, S.L. Mount, R. Raman, P. Davies, E. Masliah, D.S. Williams, L.S. Goldstein, Axonopathy and transport deficits early in the pathogenesis of Alzheimer's disease, Science 307 (2005) 1282–1288.

- [64] R.J. Vasquez, B. Howell, A.M. Yvon, P. Wadsworth, L. Cassimeris, Nanomolar concentrations of nocodazole alter microtubule dynamic instability in vivo and in vitro, Mol. Biol. Cell 8 (1997) 973–985.
- [65] M.A. Jordan, Mechanism of action of antitumor drugs that interact with microtubules and tubulin, Curr. Med. Chem. Anti-Cancer Agents 2 (2002) 1–17.
- [66] M.A. Jordan, R.J. Toso, D. Thrower, L. Wilson, Mechanism of mitotic block and inhibition of cell proliferation by taxol at low concentrations, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 90 (1993) 9552–9556.
- [67] G. Piperno, M. LeDizet, X.J. Chang, Microtubules containing acetylated alpha-tubulin in mammalian cells in culture, J. Cell Biol, 104 (1987) 289–302.
- [68] T. Stepanova, J. Slemmer, C.C. Hoogenraad, G. Lansbergen, B. Dortland, C.I. De Zeeuw, F. Grosveld, G. van Cappellen, A. Akhmanova, N. Galjart, Visualization of microtubule growth in cultured neurons via the use of EB3-GFP (end-binding protein 3-green fluorescent protein), J. Neurosci. 23 (2003) 2655–2664.
- [69] Y. Mimori-Kiyosue, N. Shiina, S. Tsukita, The dynamic behavior of the APC-binding protein EB1 on the distal ends of microtubules, Curr. Biol. 10 (2000) 865–868.
- [70] O.A. Shemesh, M.E. Spira, Paclitaxel induces axonal microtubules polar reconfiguration and impaired organelle transport: implications for the pathogenesis of paclitaxel-induced polyneuropathy, Acta Neuropathol. 119 (2010) 235–248.
- [71] C. Arregui, J. Busciglio, A. Caceres, H.S. Barra, Tyrosinated and detyrosinated microtubules in axonal processes of cerebellar macroneurons grown in culture, J. Neurosci. Res. 28 (1991) 171–181.
- [72] F.J. Kull, R.D. Sloboda, A slow dance for microtubule acetylation, Cell 157 (2014) 1255–1256.
- [73] A. Szyk, A.M. Deaconescu, J. Spector, B. Goodman, M.L. Valenstein, N.E. Ziolkowska, V. Kormendi, N. Grigorieff, A. Roll-Mecak, Molecular basis for age-dependent microtubule acetylation by tubulin acetyltransferase, Cell 157 (2014) 1405–1415.
- [74] J.M. Solowska, G. Morfini, A. Falnikar, B.T. Himes, S.T. Brady, D. Huang, P.W. Baas, Quantitative and functional analyses of spastin in the nervous system: implications for hereditary spastic paraplegia, J. Neurosci. 28 (2008) 2147–2157.
- [75] H. Sudo, P.W. Baas, Acetylation of microtubules influences their sensitivity to severing by katanin in neurons and fibroblasts, J. Neurosci. 30 (2010) 7215–7226.
- [76] Y. Konishi, M. Setou, Tubulin tyrosination navigates the kinesin-1 motor domain to axons, Nat. Neurosci. 12 (2009) 559–567.
- $[77] C. Zhao, J. Takita, Y. Tanaka, M. Setou, T. Nakagawa, S. Takeda, H.W. Yang, S. Terada, T. Nakata, Y. Takei, M. Saito, S. Tsuji, Y. Hayashi, N. Hirokawa, Charcot-Marie-Tooth disease type 2A caused by mutation in a microtubule motor KIF1B<math>\beta$ , Cell 105 (2001) 587–597.
- [78] P.D. Campbell, K. Shen, M.R. Sapio, T.D. Glenn, W.S. Talbot, F.L. Marlow, Unique function of Kinesin Kif5A in localization of mitochondria in axons, J. Neurosci. 34 (2014) 14717–14732.
- [79] M.H. Scheinfeld, R. Roncarati, P. Vito, P.A. Lopez, M. Abdallah, L. D'Adamio, Jun NH2-terminal kinase (JNK) interacting protein 1 (JIP1) binds the cytoplasmic domain of the Alzheimer's beta-amyloid precursor protein (APP), J. Biol. Chem. 277 (2002) 3767–3775.
- [80] K.J. Verhey, D. Meyer, R. Deehan, J. Blenis, B.J. Schnapp, T.A. Rapoport, B. Margolis, Cargo of kinesin identified as JIP scaffolding proteins and associated signaling molecules, J. Cell Biol. 152 (2001) 959–970.
- [81] S.P. Gross, M. Vershinin, G.T. Shubeita, Cargo transport: two motors are sometimes better than one, Curr. Biol. 17 (2007) R478–R486.
- [82] R. Mallik, A.K. Rai, P. Barak, A. Rai, A. Kunwar, Teamwork in microtubule motors, Trends Cell Biol. 23 (2013) 575–582.
- [83] S. Maday, A.E. Twelvetrees, A.J. Moughamian, E.L. Holzbaur, Axonal transport: cargo-specific mechanisms of motility and regulation, Neuron 84 (2014) 292–309.
   [84] W.J. Walter, V. Beranek, E. Fischermeier, S. Diez, Tubulin acetylation alone does
- not affect kinesin-1 velocity and run length in vitro, PLoS One 7 (2012), e42218. [85] N. Kaul, V. Soppina, K.J. Verhey, Effects of alpha-tubulin K40 acetylation and de-
- tyrosination on kinesin-1 motility in a purified system, Biophys. J. 106 (2014) 2636–2643.
  Cold Links and Marka and Mark
- [86] J. Atherton, A. Houdusse, C. Moores, MAPping out distribution routes for kinesin couriers, Biol. Cell 105 (2013) 465–487 (under the auspices of the European Cell Biology Organization).
- [87] S. Millecamps, J.P. Julien, Axonal transport deficits and neurodegenerative diseases, Nat. Rev. 14 (2013) 161–176.
- [88] E. Chevalier-Larsen, E.L. Holzbaur, Axonal transport and neurodegenerative disease, Biochim. Biophys. Acta 1762 (2006) 1094–1108.
- [89] K.R. Brunden, J.Q. Trojanowski, A.B. Smith III, V.M. Lee, C. Ballatore, Microtubule-stabilizing agents as potential therapeutics for neurodegenerative disease, Bioorg. Med. Chem. 22 (2014) 5040–5049.
- [90] P.W. Baas, F.J. Ahmad, Beyond taxol: microtubule-based treatment of disease and injury of the nervous system, Brain 136 (2013) 2937–2951.

# **Résumé et Abstract**



**Titre** : Mécanismes moléculaires et cellulaires des paraplégies spastiques héréditaires liées aux mutations du gène SPG4 : haploinsuffisance VS gain de fonction pathologique

**Mots-clés** : spastine, paraplégie spastique héréditaire, transport axonal, acétylation des microtubules, mutants spastine, neurones moteurs corticaux

**Résumé** : Les neurones sont des cellules spécialisées dans différentes fonctions, comme le contrôle des mouvements. La transmission de l'information au sein de l'axone est comparable au trafic de voitures d'une autoroute : les informations transitent dans plusieurs directions avec parfois des bouchons. Lorsque les informations n'arrivent plus à transiter, les patients peuvent souffrir de paraplégies spastiques à caractère héréditaire (PSHs), des maladies neurodégénératives. Cette thèse étudie le rôle joué par la spastine, une protéine impliquée dans certaines PSHs, et responsable de l'entretien des autoroutes. Nos résultats montrent que l'expression d'une forme mutée ou l'absence de production de la spastine, entraîne une perturbation spécifique des routes de transport et du trafic de certains composés essentiels à la survie des neurones. Dans l'ensemble, nos résultats aident à définir les effets pathophysiologies de la spastine afin de développer de nouvelles pistes de traitements.

**Title**: Cellular and molecular mechanisms of hereditary spastic paraplegia linked to SPG4mutations: haploinsufficiency VS gain of function.

**Keywords**: spastin, hereditary spastic paraplegia, axonal transport, acetylation of microtubules, spastin mutants, cortical motor neurons

**Abstract**: Central motor neurons are specialized cells involved in the control of voluntary movements in human. The transmission of information along the axon of these neurons is comparable to car trafficking in a highway: information travel in both direction and sometimes traffic jam events occur. When the transit of information are slowed or impaired, patients may suffer of neurodegenerative diseases as hereditary spastic paraplegia (HSPs). In this thesis we investigated the role of spastin, a protein implicated in HSP and the maintenance of these highways. Our results showed that depletion of spastin, or expression of its mutants, lead to a disturbance of both the integrity of these "road" and the traffic of cellular components primary involved in axonal survival and growth. These results would help to elucidate the pathophysiological mechanisms implicated in the onset of this pathology and maybe in developing proficient therapeutic strategy for HSP patients.