



**HAL**  
open science

# Dysfonctions des lysosomes et neurodégénérescence : l'exemple de la paraplégie spastique de type SPG11

Maxime Boutry

► **To cite this version:**

Maxime Boutry. Dysfonctions des lysosomes et neurodégénérescence : l'exemple de la paraplégie spastique de type SPG11. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2017. Français. NNT : 2017PA066295 . tel-01707839

**HAL Id: tel-01707839**

**<https://theses.hal.science/tel-01707839>**

Submitted on 13 Feb 2018

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# Université Pierre et Marie Curie

Ecole doctorale Cerveau, Cognition et Comportement (ED 158)

*Institut du Cerveau et de la Moelle épinière /*

*Bases moléculaires, physiopathologie et traitement des maladies neurodégénératives*

## **Dysfonctions des lysosomes et neurodégénérescence: l'exemple de la paraplégie spastique de type SPG11**

Par Maxime Boutry

Thèse de doctorat de Neurosciences

Dirigée par Frédéric Darios

Présentée et soutenue publiquement le 13 décembre 2017

Devant un jury composé de :

Dr COMBETTES Laurent

Dr ALPY Fabien

Dr RAPOSO Graça

Dr BURGO Andrea

Pr TREMBLEAU Alain

Dr DARIOS Frédéric

Rapporteur

Rapporteur

Examinatrice

Examineur

Examineur

Directeur de thèse





## Remerciements :

Je tiens tous d'abord à remercier l'UPMC (via l'ED3C) pour m'avoir permis de réaliser cette thèse. Merci à l'EPHE pour m'avoir permis de finir ce travail et de le poursuivre dans les prochains mois. Merci à messieurs Fabien Alpy et Laurent Combettes d'avoir acceptés d'être les rapporteurs de ce travail. Merci à Mme Graça Raposo, Mr Andrea Burgo et Mr Alain Trembleau pour avoir accepté de faire partie du jury de cette thèse.

Un très, très grand merci à toi Fred ! Cela a été un véritable plaisir de travailler sous ta direction. Tu as toujours été disponible pour mes nombreuses questions techniques et théoriques et les discussions ont toujours été très productives. J'ai énormément appris au cours de cette thèse et je ne pourrais jamais te remercier assez ! C'était génial de t'avoir comme encadrant !

Gio, merci beaucoup pour les premiers mois (et du coup, les derniers aussi) sous ta direction et surtout pour les bon moments à rigoler autour d'une bière et de chips. C'était super de pouvoir venir te voir et de profiter de tes blagues (presque) souvent drôles. Merci aussi pour les nombreux conseils et idées !

Je tiens à remercier Alexis Brice pour m'avoir accueilli dans son équipe.

Typhaine, merci de m'avoir montré tout plein de manips et répondu à toutes ces questions sans jamais perdre patience. Tu as été comme une grande sœur durant le master et la thèse et ton retour dans l'équipe est super ! Vivement les, tant attendues, prochains pisco et margaritas !

Claire, merci encore pour tout ce que tu as pu faire pour moi et pour tout ton aide pour la relecture et l'impression du manuscrit. Merci pour toutes les discussions entre voisins, les bières et les concerts ! Tant de (bons) groupes découverts grâce à toi et de moment géniaux ! J'espère que cela continuera !

Raph on a bien rigolés et on a pu apprécier les bons alcools (rhums de qualité) comme les mauvais (te souviens-tu de cette villageoise, cru 2017 ?). Ce fut un bonheur de travailler avec toi et de bénéficier de ta maîtrise de l'arrayscan et autre spinning-disk ! De bons films et séries découverts grâce à toi, merci !

Ma chère Livia, j'attends avec une excitation toute particulière le début de la coupe du monde. Je pourrai me délecter de tes larmes quand le silence assourdissant de l'absence de l'hymne italien retentira. Tu as été une voisine de bureau fantastique qui sait apprécier à sa juste valeur le meilleur plat au monde : les lasagnes.

Marc, champion, 23 à 0. C'est la piquette Jack, t'es mauvais. C'était un plaisir de travailler avec toi, merci pour les fous rires !

Ma chère Julie, la pernelle de nos yeux, je ne me prononcerai pas sur ton recrutement par Fred. Toutefois, j'ai adoré discuter et rigoler avec toi. Tu as un humour génial ! C'était un grand plaisir de s'envoyer des petites moqueries (toujours méritées). Très bon recrutement du chef !

Merci pour toute la gestion de la partie souris du projet Julien et surtout merci pour les soirées super sympa chez toi et tes Rhums de l'oncle Bwanchu !

Priscilla, tu es super. J'ai adoré travaillé en étant ton presque voisin ! Je ne peux que te dire merci pour ta bonne humeur et ton caractère très attachant ! Bien sûr, cela va sans dire, tout ces compliments ne tiennent que si tu as ramené des cannellés à mon pôt de thèse !!!

Charles, mon pote, merci beaucoup pour les Happy Hours, la Norvège et les Bières. En écrivant cela je me remémore Banyuls et ses murettes. AH. Une dernière question pour toi, j'ai un article de deux scientifiques russes qui postule l'existence d'un réseau de Myéline dans le menton. Crédible ?

Les axonautes, mes chères Cynthia et Emilie merci beaucoup. La fabrication des vidéos a été géniale !

Giampi t'es un mec génial ! Un grand plaisir la Norvège. Tu es plus belle en blonde.

Mimi, le choixpeau magique a parlé : Poufsouffle.

Merci à vous les Ajités, merci pour les Pizza et les bières et autres évènements : Chef Lindsay, Sami, Morwena, en particulier merci encore.

Un grand merci à Céline et Marine qui m'ont beaucoup aidé durant mes premiers mois de thèse.

Marion, Morgane c'était super sympa le début de thèse grâce à vous ! Vous êtes parties trop tôt ;)

Un énorme merci à Vincent pour toute son aide aussi bien scientifique que pour l'organisation des Happy Hours et aussi pour l'aide pour trouver et réserver la salle de soutenance ! Merci à Daisy et Isabelle pour la réservation de la Salle de soutenance.

Alex merci de reprendre la suite, tu es d'un grande aide pour les expériences ! Avec toi l'Happy Hour est entre de bonne main (Pas de 8.6 s'il te plaît !)

Merci beaucoup Marie-luce, pour les commandes, les fournitures, les réservations et paiement pour les congrès et les petites blagues !

Merci à tous les membres de l'équipe présents et passé qui ont rendus ce travaille de thèse si agréable : Emeline (4<sup>ème</sup> Dan, maîtrise de l'élément marin), Fiona (j'espère que tu m'inviteras à tes featurings avec Booba), Belen (Aussi gentille que petite), François (merci pour les conseils), Valérie (Ne m'oublie pas j'aurais peut-être besoin de toi pour trouver du travail plus tard), Maxime (De grandes joies : PSG-Chelsea 2-2 et de grandes désillusions : les PSG-Barcelone, merci pour tes blagues et ta bonne humeur), Marie (les bonne bières belges !), Julie (merci pour les bonnes rigolades et ton accent ch'ti d'exception), Baptiste (grand merci pour l'Happy Hour), Yoan (merci pour ton aide sur le cholestérol), Héléne (Trop de fromage le midi hélène), Mélanie (jeté de cacahuètes magnifique), Agnès (Plaisir de boires ces bières à tous les derniers jeudi du mois), les différents étudiants ESTBA : Fiona, Victorine et marine.

Merci aux différents PI de l'équipe et en particulier Hamid et Olga, vos questions auront été précieuses. Merci à Alexandra pour les questions et précisions sur la clinique des patients.

Yassine et romain vous êtes des vrais potes, votre humour assez douteux a été d'une grande aide !

Frangin, Alex, Alain, Enzo et Lisandro je ne pourrais jamais vous remercier assez ! Vous êtes géniaux ! Vivement que les petits grandissent !

Merci Papa pour m'avoir poussé un peu quand il le fallait, ça m'a permis d'aller à l'ESTBA et finalement c'était un peu le début de la thèse ! Merci pour les whiskey japonais toujours aussi bon à déguster !

Ma chère Mamie, jamais je ne pourrais te remercier assez pour tout ce que tu as fait pour moi depuis que je suis petit !

Solène, ma chérie, merci de m'avoir supporté tout au long de cette thèse. Je sais que cela n'a pas été toujours facile notamment durant l'écriture du manuscrit de thèse ! Merci pour tout !

Maman, je finis par le plus important. Je ne pourrais bien sûr pas te remercier assez pour TOUT. Je sais l'importance de cette thèse pour toi. J'espère que rendre fière et contente. C'est le meilleur des diplômes.

## Liste des abréviations :

ALR : Autophagic lysosome reformation

AP: Adaptor protein

ATG : Autophagy related genes

BAR : Bin–amphiphysin–rvs

CYP: Cytochrome P450

ERAD: Endoplasmic reticulum associated degradation

GalNAcT : N-acétylgalactosamine transferase

GBA1: Glucocerebrosidase 1

GD : Ganglioside-disialic acid

GFP : Green fluorescent protein

GFP-D4: Domaine 4 de la perfringolysin O couplé à la GFP

GM : Ganglioside-monosialic acid

GT : Ganglioside-trisialic acid

IP3 : Inositol tri-phosphate

iPS : induced Pluripotent Stem cells

KIF : Kinesin superfamily protein

Lamp: Lysosomal-associated membrane protein

LC3 : Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3

LDL: Low density lipoprotein

ML-IV : Mucopolidoses de type IV

ML-SA1 : Mucolipin synthetic agonist 1

MSL: Maladies de surcharge des lysosomes

mTORC1: Mammalian target of rapamycin complex 1

NAADP: Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate

NPC : Niemann-Pick de type C

Orai : Protéines nommées depuis les Heures (en grec ancien Ὠραὶ / Hôrai, « saisons », en latin Horae) qui sont des déesses mentionnées comme gardiennes des portes de l'Olympe dans l'Illiade

p62: Ubiquitin-binding protein p62

PI(3,5)P<sub>2</sub>: Phosphatidyl inositol-3,5-biphosphate

PI(4,5)P<sub>2</sub>: Phosphatidyl inositol-4,5-biphosphate

PIP<sub>2</sub>: Phosphatidyl inositol biphosphate

PSH : Paraplégie spastique héréditaire

RE : Réticulum endoplasmique

SARAF: SOCE-associated regulatory factor

SERCA: Sarco endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase

SLA : Sclérose latérale Amyotrophique

SNARE : Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor attachment protein receptor

SNC: Système nerveux central

SOCE : Store-operated calcium entry

SPG : Spastic paraplegia

STIM : Stromal interaction molecule

TFEB: Transcription factor EB

TIRF : Total internal reflection fluorescence

TPCs : Two-pore channels

TRPML : Transient receptor potential cation channel, mucolipin subfamily

UPR: Unfolded protein response

# Table des matières

Remerciements : .....	2
Liste des abréviations : .....	4
Préambule : .....	11
Introduction : .....	12
I) Dysfonction des lysosomes et neurodégénérescence : .....	12
1) Les lysosomes : .....	12
2) Fonctions des lysosomes : .....	13
(a) Fonctions de dégradation : .....	13
(i) Fusions vésiculaires : .....	13
(ii) Dégradation de composés extracellulaires : .....	13
(iii) Dégradation de composés intracellulaires : l'Autophagie : .....	16
(b) Rôle des lysosomes dans la signalisation: .....	17
3) Importance des lysosomes pour les cellules et en particulier les neurones : exemple des maladies de surcharge des lysosomes (MSL) : .....	20
(a) Les maladies de surcharge des lysosomes (MSL) : .....	20
(i) Signes cliniques : .....	20
(ii) Accumulation de lipides et mort neuronale : l'exemple de la maladie de Niemann-Pick de type C : .....	21
(b) Voies cellulaires affectées dans les maladies de surcharges des lysosomes : .....	23
(i) L'homéostasie calcique .....	23
(1) Mucopolysaccharidose de type IV .....	24
(2) Niemann-Pick de type C : .....	25
(3) Syndrome de Chediak-Higashi : .....	26
(4) Homéostasie calcique du réticulum endoplasmique dans les MSL : .....	27
(ii) L'endocytose : .....	28
(iii) L'autophagie : .....	30
4) Importance de l'autophagie pour les neurones : .....	31
(a) Effet neuroprotecteur : .....	31
(b) Altérations/dérégulations de l'autophagie dans les maladies neurodégénératives : .....	32
(i) Activation trop importante ou mal régulée de l'autophagie : effet délétère .....	32
(ii) Blocage ou inhibition des voies d'autophagie : .....	33
5) La reformation des lysosomes après autophagie : .....	34
(a) L'« autophagic lysosome reformation » (ALR) : .....	35
(i) Initiation de l'ALR : .....	35
(ii) Elongation des tubules : .....	36

(iii)	Scission des tubules et libération de lysosomes immatures :.....	37
(iv)	ALR par vésiculation :.....	37
(b)	La reformation des lysosomes : importance pour le système nerveux central:.....	38
II)	Dysfonctions des lysosomes dans les paraplégies spastiques héréditaires (PSH) : .....	40
1)	Les paraplégies spastiques héréditaires :.....	40
(a)	Le Faisceau corticospinal : .....	40
(b)	Symptômes des PSH :.....	41
(c)	Diagnostic des PSH : .....	42
(d)	Causes génétiques et modes de transmission des PSH :.....	42
2)	Les voies cellulaires impliquées dans les PSH :.....	43
(a)	La mise en place et le maintien de la morphologie du réticulum endoplasmique (RE) :.....	44
(b)	Métabolisme des lipides : .....	46
(c)	Voies endolysosomales : .....	47
3)	La PSH de type SPG11 : .....	50
(a)	Description clinique :.....	50
(b)	Génétique et chevauchement avec d'autres pathologies :.....	51
(c)	La spatacsine :.....	51
(i)	Localisation :.....	52
(ii)	Fonctions :.....	52
(iii)	Les interacteurs de la spatacsine et altérations des voies endolysosomales :.....	53
(iv)	La spatacsine et la reformation des lysosomes : .....	54
(v)	Questions en suspens:.....	55
	Objectifs :.....	58
	Résultats :.....	59
I)	Article 1 : Modèle murin de la PSH de type SPG11.....	59
1)	Introduction :.....	59
2)	Résumé : .....	60
3)	Article 1 : .....	62
4)	Contribution :.....	63
5)	Discussion :.....	65
6)	Conclusion :.....	66
II)	Article 2 : Les gangliosides et la reformation des lysosomes dans les neurones :.....	67
1)	Introduction :.....	67
2)	Résumé : .....	69
3)	Article 2 : .....	71
4)	Contribution :.....	72

5)	Discussion :.....	73
6)	Conclusion :.....	76
III)	Article 3 : Des altérations de l'homéostasie calcique contribuent à l'accumulation de cholestérol dans les lysosomes des cellules <i>Spg11<sup>-/-</sup></i> :.....	77
1)	Introduction :.....	77
	L'homéostasie calcique cellulaire :.....	78
(i)	Signalisation calcique :.....	78
(ii)	Régulation taux de calcium et compartimentation:.....	78
(iii)	Le réticulum endoplasmique ; le réservoir principal de calcium intracellulaire :.....	78
(iv)	Echanges de calcium du réticulum vers d'autres organites :.....	80
(v)	Les lysosomes et le calcium :.....	80
(vi)	Le « Store-Operated Calcium Entry » (SOCE).....	82
(vii)	Régulation de l'homéostasie calcique entre les compartiments cellulaires étudiés au cours de la thèse :.....	84
2)	Résumé :.....	86
3)	Article 3 :.....	89
4)	Contribution :.....	90
5)	Discussion :.....	90
6)	Conclusion :.....	92
IV)	Liens entre les accumulations de gangliosides et de cholestérol :.....	93
1)	Co-accumulations du ganglioside GM2 et du cholestérol:.....	93
(a)	Accumulations primaires du ganglioside GM2 :.....	93
(b)	Accumulations primaires de Cholestérol :.....	94
2)	Liens expérimentaux entre les accumulations de GM2 et de cholestérol :.....	95
(a)	Accumulations du GM2 et du cholestérol, respectivement, dans les fibroblastes et les neurones <i>Spg11<sup>-/-</sup></i> :.....	95
(b)	L'inhibition de l'efflux du cholestérol des lysosomes induit une accumulation massive de GM2 :.....	97
(c)	Effet de la modulation de l'homéostasie calcique sur l'accumulation des gangliosides :.....	99
3)	Conclusion et perspectives :.....	100
	Discussion :.....	102
I)	Le modèle murin <i>Spg11<sup>-/-</sup></i> :.....	103
1)	Pertinence du modèle :.....	103
2)	Comparaison avec le modèle d'une équipe concurrente :.....	103
3)	Dysfonctions des lysosomes et accumulation de lipides observées dans le modèle <i>Spg11<sup>-/-</sup></i> :..	105
II)	Dysfonctions des lysosomes : Les accumulations de lipides dans les lysosomes et leurs conséquences:.....	107

1)	Nature des lipides qui s'accumulent : .....	107
(a)	Les gangliosides simples : .....	107
(i)	Accumulation de gangliosides simples dans les lysosomes : altération de leur dégradation : .....	107
(ii)	Accumulation du ganglioside GM2 dans d'autres pathologies : .....	108
(b)	Le cholestérol : .....	109
(i)	Accumulation de cholestérol dans les lysosomes : .....	109
(ii)	Accumulations de cholestérol dans les lysosomes des cellules du système nerveux central : 110	
(iii)	Accumulations de cholestérol dans d'autres maladies : .....	111
(c)	La PSH de type SPG11 est-elle une MSL ? .....	112
2)	Accumulation primaire de lipides: .....	113
(a)	Les accumulations de cholestérol et gangliosides sont liées dans la PSH de type SPG11 : 113	
(b)	Arguments en faveur d'une accumulation primaire de cholestérol : .....	113
(c)	Arguments en faveur d'une accumulation primaire de gangliosides : .....	115
3)	Les conséquences physiopathologiques des accumulations de lipides : .....	116
(a)	Accumulation de gangliosides et cholestérol et perturbation du processus de reformation des lysosomes : .....	116
(i)	Perturbation du recyclage des lysosomes dans la PSH de type SPG11 : .....	116
(ii)	Impact des accumulations de lipides sur le recyclage des lysosomes : .....	117
(iii)	Mécanisme mis en jeu dans la perturbation du recyclage des lysosomes par les accumulations de lipides : .....	118
(iv)	Autres pathologies avec accumulations de GM2 et de cholestérol : .....	120
(b)	Les conséquences des accumulations de lipides sur la survie des neurones : .....	120
(i)	La mort neuronale <i>in vitro</i> : .....	120
(ii)	La reformation des lysosomes dans les neurones : .....	121
(iii)	La reformation des lysosomes et la neurodégénérescence : .....	121
(iv)	L'inhibition de la synthèse des gangliosides comme stratégie thérapeutique : .....	123
(c)	Accumulations de lipides ou problème de recyclage des lysosomes dans d'autres types de PSH : 124	
III)	Les mécanismes à l'origine de l'accumulation de lipides : .....	126
1)	L'altération de l'efflux des lipides des lysosomes : .....	126
(a)	L'export des lipides des lysosomes vers les gouttelettes lipidiques en conditions autophagiques : .....	126
(b)	L'efflux des gangliosides et du cholestérol : .....	127
2)	Dérégulation de l'homéostasie calcique : .....	128
(a)	Impact de ces dérégulations sur les dysfonctions des lysosomes : .....	129
(i)	L'augmentation de l'import de Ca <sup>2+</sup> par le SOCE : .....	129

(ii)    Le calcium des lysosomes :.....	130
(b)    Les origines possibles des dérégulations de l'homéostasie calcique : .....	131
(i)    Le SOCE : .....	131
(ii)    Le calcium des lysosomes :.....	133
3)    La spatacsine :.....	134
Conclusion générale :.....	136
Perspectives :.....	138
I)    Inhibition de la synthèse des gangliosides et stratégie thérapeutiques :.....	138
II)   Exploration des fonctions moléculaires de la spatacsine :.....	139
II)   Lien entre la perte de fonction de la spatacsine et la dérégulation de l'homéostasie calcique : 140	
Bibliographie : .....	142
Résumé :.....	156
Abstract:.....	157



## Préambule :

Depuis ma première année de master je m'intéresse aux causes et conséquences physiopathologiques d'un groupe de maladies neurodégénératives : les paraplégies spastiques héréditaires (PSH). J'ai, dans un premier temps, participé à l'étude fonctionnelle d'un gène impliqué dans une forme rare de PSH : *REEP2*. La protéine codée par ce gène participe à la formation et au maintien de la morphologie du réticulum endoplasmique (RE). Cette étude a montré que la maladie est causée par la perte de fonction de *REEP2*, et nous avons montré que cette perte de fonction peut-être causée par un variant qui agit comme un dominant négatif (Esteves et al., 2014).

Au cours de ma thèse j'ai étudié le rôle des lysosomes, compartiments cellulaires clefs dans la dégradation de composés intra et extracellulaires, dans la physiopathologie de maladies neurodégénératives. Durant ces dernières années, de nombreuses études mettent en évidence un rôle crucial de ces organites dans le bon fonctionnement du système nerveux central et des dysfonctions des lysosomes sont à l'origine ou participent à de nombreuses pathologies.

Pour étudier le rôle des lysosomes dans un contexte neurodégénératif, j'ai utilisé un modèle de la PSH de type SPG11, une pathologie dans laquelle des dysfonctions lysosomales sont en cause. J'ai ainsi participé à la mise en évidence d'accumulations de lipides dans les lysosomes des neurones et de fibroblastes provenant d'un modèle murin de la pathologie généré par le laboratoire (article 1 : Branchu et al, 2017). Les lipides qui s'accumulent dans les lysosomes des cerveaux sont majoritairement des gangliosides, une espèce de glycolipides, et j'ai montré que leur accumulation altère le bon recyclage des lysosomes (article 2 : Boutry et al, En préparation). Une perturbation de l'homéostasie du cholestérol, résultant d'une sortie perturbée du cholestérol des lysosomes, est aussi observée dans des fibroblastes et peut-être corrigée par une modulation de l'homéostasie calcique (article 3 : Boutry et al, en préparation). Ainsi au cours de ce travail, j'ai pu montrer l'importance des lysosomes dans un modèle de neurodégénérescence et notamment dans le métabolisme des lipides.

Ces travaux seront illustrés par trois articles:

Article 1: Branchu et al, 2017. Loss of spatacsin function alters lysosomal lipid clearance leading to upper and lower motor neuron degeneration. *Neurobiology of disease*. Jun;102:21-37. doi: 10.1016/j.nbd.2017.02.007

Article 2: Boutry et al. Ganglioside accumulation impedes lysosomal membrane recycling and promotes neurodegeneration. (En preparation)

Article 3: Boutry et al. Store operated calcium entry contributes to lysosomal accumulation of cholesterol. (En préparation)

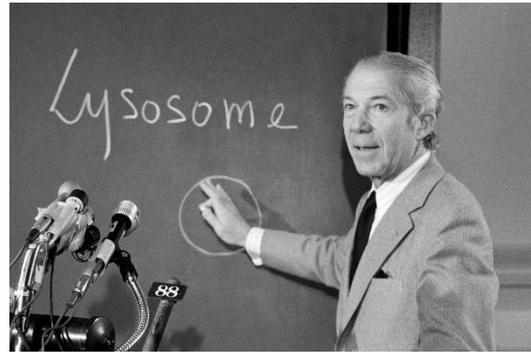


## Introduction :

### I) Dysfonction des lysosomes et neurodégénérescence :

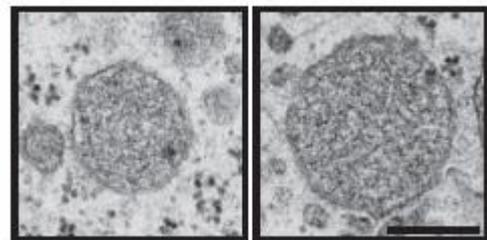
#### 1) Les lysosomes :

Les lysosomes sont des organites cellulaires vésiculaires de quelques centaines de nanomètres de diamètre. Ils ont été décrits pour la première fois en 1955 par Christian de Duve (Figure 1) qui a pu mettre en évidence leur existence par l'utilisation de techniques de centrifugation couplées à la détection de l'activité de certaines enzymes. L'analyse biochimique de ces enzymes a laissé apparaître qu'elles ne pouvaient pas se trouver dans des organites déjà décrits à l'époque : les mitochondries (Robert Wattiaux, Revue des Questions Scientifiques 2010). La fonction postulée de ces organites, qui ne semblent contenir que des enzymes hydrolytiques, est alors la dégradation de matériels exogènes internalisés par la cellule par pinocytose ou phagocytose. Des molécules extracellulaires, mais aussi des virus ou des bactéries, sont internalisés dans la cellule dans des vésicules qui sont amenées à fusionner avec les lysosomes et sont ainsi dégradées. Ces hypothèses seront rapidement confirmées expérimentalement. Des organites semblables sont présents chez les levures et chez les plantes : ce sont les vacuoles.



**Figure 1 : Christian de Duve à l'université Rockefeller en 1974 (New York Times)**

Ainsi, les lysosomes sont des vésicules sphériques (Figure 2) contenant des enzymes hydrolytiques capables de dégrader des protéines, lipides et sucres. Le pH de la lumière des lysosomes est extrêmement régulé par une pompe à proton (V-ATPase) qui permet l'établissement d'un pH acide (~4-5) nécessaire au bon fonctionnement des enzymes lysosomales (Mindell, 2012). Pour résister à l'action de ces enzymes, la membrane intérieure du lysosome ainsi que les protéines qui la composent sont hautement glycosylées. Cet ensemble forme un glycocalyx. C'est le cas de la protéine Lamp1, protéine de la membrane du lysosome et des endosomes tardifs, dont le poids moléculaire double avec l'ensemble des glycosylations. Les protéines qui composent le lysosome sont synthétisées au niveau du réticulum endoplasmique (RE) et subissent des modifications post-traductionnelles dans l'appareil de Golgi avant d'être adressées aux lysosomes.



**Figure 2 : Image en microscopie électronique de deux lysosomes de fibroblastes de souris. Barre d'échelle = 200nm**

Environ 50 enzymes différentes capables de dégrader des protéines, des lipides, des sucres ou des acides nucléiques sont contenues dans les lysosomes. Plus d'une centaine de protéines différentes sont associées à la membrane externe des lysosomes, les protéines Lamp1 et Lamp2 représenteraient la moitié des protéines totales de cette membrane (Eskelinen, 2006).

## 2) Fonctions des lysosomes :

Les lysosomes ont deux grands types de fonctions : des fonctions de dégradation qui ont été étudiées depuis leur découverte mais aussi des fonctions de signalisation, identifiées plus récemment.

### (a) Fonctions de dégradation :

#### (i) Fusions vésiculaires :

Pour accomplir leurs fonctions de dégradation les lysosomes reçoivent les composés à dégrader principalement via un mécanisme de fusion des lysosomes avec la vésicule à dégrader. La fusion de vésicules, comme les endosomes ou les lysosomes avec d'autres vésicules ou même la membrane plasmique fait intervenir une machinerie protéique composée notamment de protéines SNARE (Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor) (Luzio et al., 2007) (Figure 3B). Ces complexes participent à l'attachement des vésicules ensemble ainsi qu'à la fusion des membranes entre elles. La fusion des lysosomes avec des endosomes fait également intervenir une signalisation calcique (Luzio et al., 2007).

#### (ii) Dégradation de composés extracellulaires :

Les lysosomes sont impliqués dans la dégradation de molécules d'origine extracellulaire, internalisées par endocytose, soit pour la dégradation de pathogènes (phagocytose) ou pour l'absorption de molécules essentielles à la survie de la cellule (Figure 3 A). L'endocytose est l'internalisation, au sein de vésicules formées par l'invagination de la membrane plasmique, de composés extracellulaires ou de composés de la membrane plasmique.

Par exemple, pour se fournir en cholestérol exogène les cellules expriment à leur membrane plasmique des récepteurs aux LDL (Low density Lipoprotein) qui contiennent du cholestérol. Les récepteurs aux LDL sont concentrés dans des puits à endocytose recouverts, sur leur face interne, de clathrine (Anderson et al., 1977). Les molécules de clathrine s'assemblent les unes avec les autres et forment des structures qui permettent la formation et le maintien de la vésicule formée lors de l'endocytose. La liaison du LDL à son récepteur entraîne son internalisation par endocytose et aboutit à la formation d'une vésicule d'endocytose qu'on appelle un endosome et qui contient le LDL. L'endosome, durant sa maturation, voit son pH diminuer ce qui induit la dissociation du

récepteur et du LDL (Goldstein and Brown, 2009). A terme cette vésicule fusionne avec un lysosome.

Les LDL sont hydrolysés par les enzymes lysosomales libérant ainsi des acides aminés et des lipides dont le cholestérol. Les acides aminés sont transportés dans le cytoplasme pour être utilisés dans la traduction alors que les protéines NPC1 et NPC2 (NPC : Niemann-Pick de type C) transporteront le cholestérol hors des lysosomes (Infante et al., 2008). Par l'action de transporteurs protéiques le cholestérol est envoyé vers les différents compartiments cellulaires dont la membrane plasmique. Cet exemple illustre notamment l'importance des lysosomes dans l'acquisition de nutriments par la cellule.

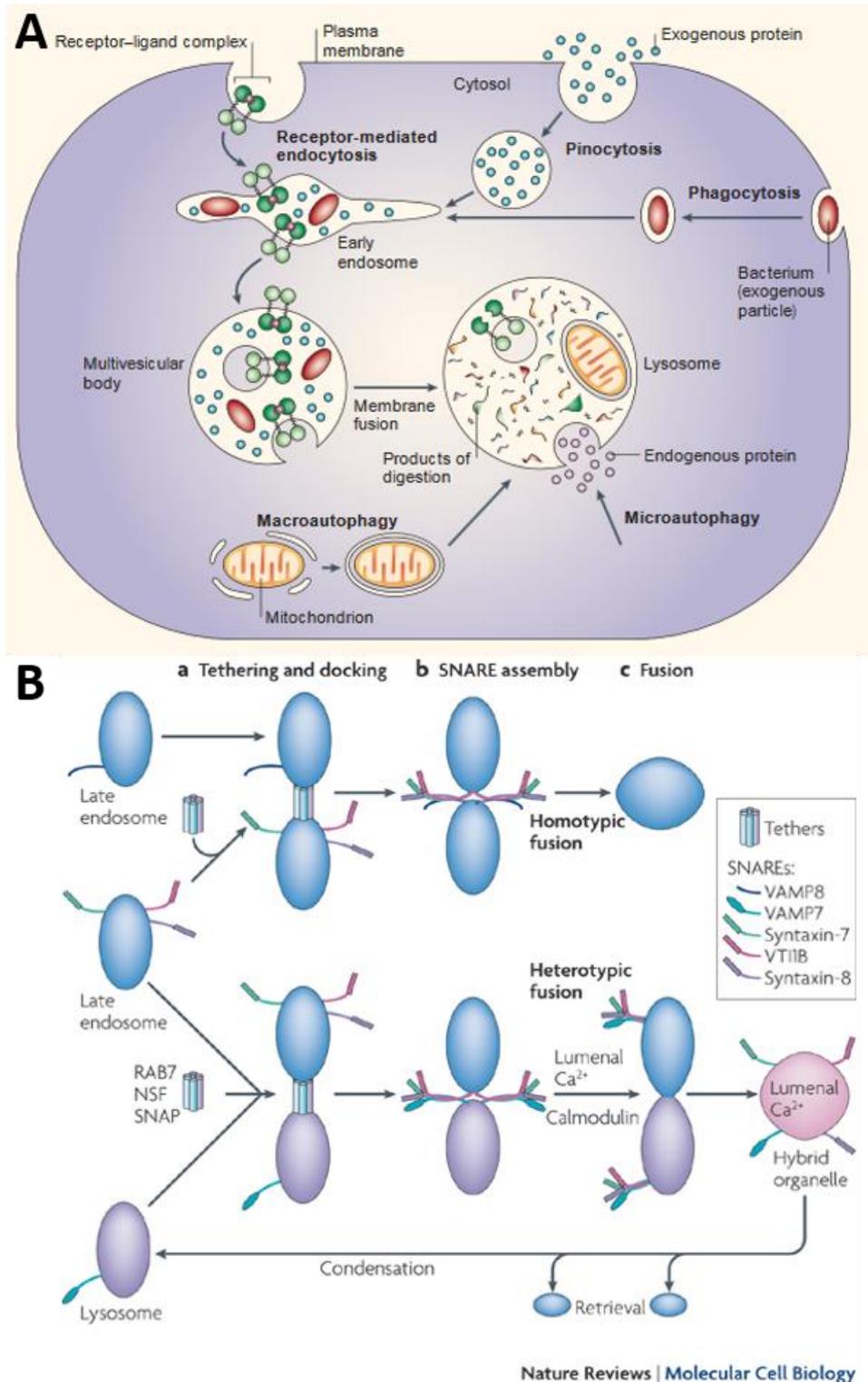


Figure 3 : (A) Les différentes voies aboutissant à la dégradation lysosomale. Les voies d'endocytose et de pinocytose permettent de capturer des molécules extracellulaires qui sont encapsulées dans des vésicules qui fusionnent avec les lysosomes pour dégrader leurs contenus. De manière similaire des pathogènes peuvent être incorporés par phagocytose pour être éliminés et des composants de la cellule peuvent être recyclés par les processus autophagiques (Ciechanover, 2005). (B) La fusion des endosomes entre eux ou avec les lysosomes fait intervenir une machinerie protéique composée de protéines de la famille SNARE et est déclenchée par une signalisation calcique (Luzio et al., 2007).

### (iii) Dégradation de composés intracellulaires : l'Autophagie :

Les lysosomes sont aussi impliqués dans la dégradation et le recyclage de composants internes de la cellule. Lorsque des organites ou des composants de la cellule sont endommagés, ou dans des conditions de stress nutritif, les cellules ont recours au processus de l'autophagie pour recycler une partie de leurs organites (Rabinowitz and White, 2010).

L'autophagie est un mécanisme de dégradation de composants cellulaires dépendant des lysosomes qui est extrêmement conservé au cours de l'évolution. On distingue aujourd'hui trois grands types d'autophagie :

- la microautophagie : les matériels à dégrader sont directement incorporés dans le lysosome (Figure 3 A).
- l'autophagie médiée par des protéines chaperons : les protéines chaperonnes reconnaissent des protéines du cytosol qui sont à dégrader. Ces protéines sont alors envoyées au lysosome et subissent une translocation à travers la membrane des lysosomes (Tasset and Cuervo, 2016).
- La macroautophagie : les matériels à dégrader sont encapsulés dans une vésicule, appelée autophagosome, qui est composée d'une double membrane. L'autophagosome fusionne ensuite avec des lysosomes en utilisant les protéines SNARE (Figure 3 B) permettant la dégradation du contenu de l'autophagosome (Figure 4). Les substrats à dégrader peuvent être choisis sélectivement. Par exemple, la protéine cytosolique p62 se lie de manière non-covalente aux protéines préalablement ubiquitinylées via un domaine d'interaction avec l'ubiquitine (Lippai and Lów, 2014). Les cargos reconnus par p62 sont incorporés dans l'autophagosome en formation, par la liaison directe de p62 à la protéine de la membrane de l'autophagosome LC3-II (Pankiv et al., 2007). La protéine p62 reconnaît ainsi les substrats à dégrader par autophagie (Figure 4).

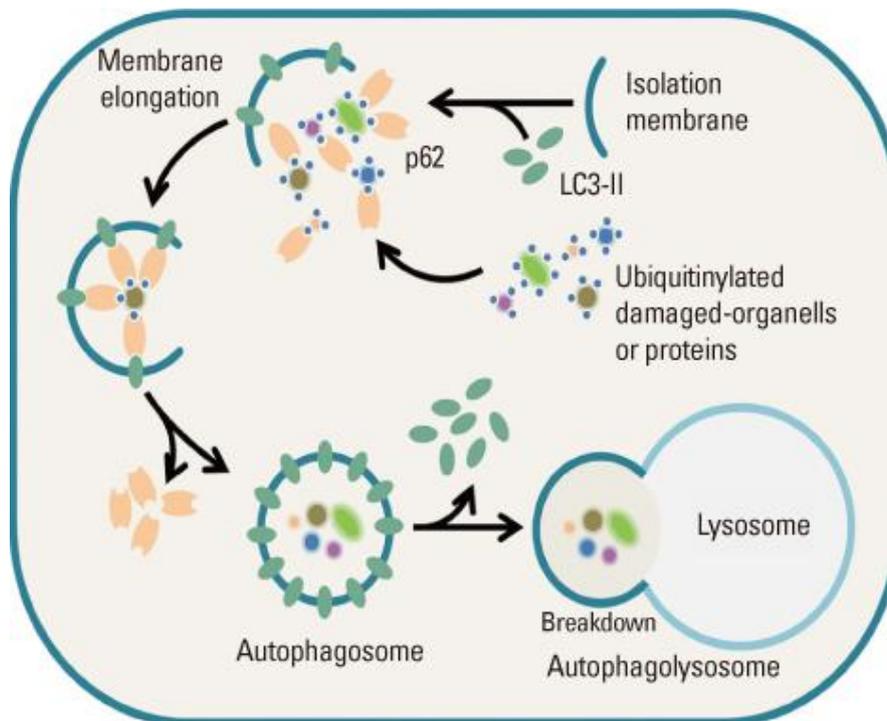


Figure 4 : Macroautophagie dite sélective. Les substrats ubiquitinylés à dégrader sont reconnus par le récepteur p62, qui permet l'incorporation des substrats dans l'autophagosome par liaison avec la protéine LC3-II (Choi and Kim, 2013).

Ces trois modes d'autophagie ont été décrits chez les levures et les cellules de mammifères (Boya et al., 2013; Nakatogawa et al., 2009). La macroautophagie est le type d'autophagie le plus étudié et le mieux connu à l'heure actuelle.

### (b) Rôle des lysosomes dans la signalisation:

La fusion avec les lysosomes et la dégradation qui en résulte est donc « l'étape finale » des voies d'endocytose, de phagocytose et de l'autophagie. Pour cette raison, les lysosomes sont parfois métaphoriquement appelés « estomac de la cellule ». Ainsi, pendant de nombreuses années les lysosomes ont été considérés presque uniquement comme des vésicules remplies d'enzymes digestives dont le rôle est la dégradation de protéines, lipides et sucres.

Toutefois, depuis quelques années de très nombreuses études ont permis d'apprécier ces organites dans leur plus grande complexité. Il apparaît de plus en plus clairement que les lysosomes sont très dynamiques et participent à la régulation de nombreuses voies de signalisation et ne possèdent pas seulement un rôle de digestion (Perera and Zoncu, 2016). Ces organites sont vitaux dans la détection des niveaux des différentes molécules dans la cellule et dans la réponse cellulaire aux modifications de ces niveaux.

Par exemple, la voie de signalisation impliquant mTORC1 (mammalian target of rapamycin complex 1) et TFEB (Transcription Factor EB) illustre très bien ce rôle : en condition normale le complexe mTORC1 est activé et localisé au niveau de la membrane cytosolique des lysosomes. Dans cette condition, mTORC1 phosphoryle le facteur de transcription TFEB ce qui permet l'interaction entre TFEB et les protéines 14-3-3. TFEB est ainsi confiné dans le cytosol. Lors de la diminution des niveaux de nutriments dans la cellule, induite par une déprivation en acides aminés par exemple, le complexe mTORC1 est inactivé. TFEB n'est donc pas phosphorylé et peut entrer dans le noyau, ce qui permet la transcription d'un certain nombre de gènes codant pour des protéines impliquées dans des fonctions d'autophagie et des fonctions lysosomales (Sardiello et al., 2009; Settembre et al., 2011, 2012). TFEB est ainsi impliqué dans la biogénèse des lysosomes. La production d'enzymes lysosomales et de protéines de la membrane des lysosomes permet de réguler le nombre et la fonction des lysosomes. Dans des conditions où des matériaux s'accumulent dans les lysosomes, TFEB subit une translocation dans le noyau et active des gènes codant pour des enzymes lysosomales pour augmenter le catabolisme (Sardiello et al., 2009). Une signalisation calcique provenant des lysosomes participe aussi à la translocation de TFEB dans le noyau. La diminution en nutriments induit une libération de calcium par le canal calcique lysosomal TRPML1 (aussi appelé mucolipin1). Cette libération locale de calcium active la calcineurine qui déphosphoryle TFEB permettant son activation (Figure 5) (Medina et al., 2015). Le lysosome est ainsi une plateforme d'où convergent un nombre important de voies de signalisation.

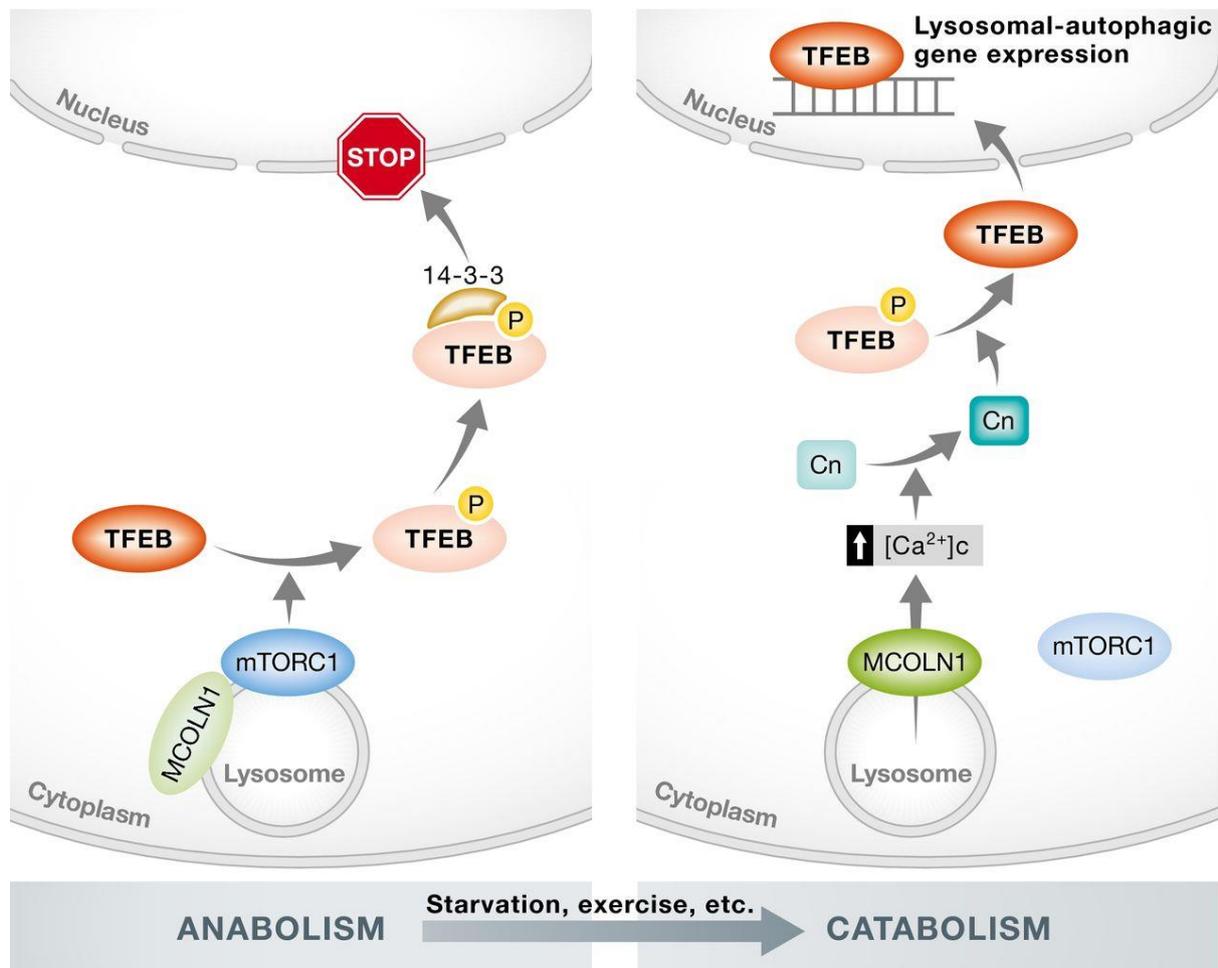


Figure 5 : Translocation du facteur de transcription TFEB du cytoplasme vers le noyau. En condition particulière (déprivation, exercice physique, etc.) la protéine mTORC1 est inhibée et TFEB peut être déphosphorylée par la calcineurine (Cn) qui est elle-même activée par la libération de calcium des lysosomes par l'action du canal calcique MCOLN1 (ou TRPML1) (Ballabio, 2016).

Les lysosomes ont aussi d'autres fonctions. Ils sont capables de subir une exocytose qui peut être déclenchée dans le but de fournir du matériel membranaire à la membrane plasmique ou pour la réparer, pour augmenter sa surface, un processus mis en évidence pour la croissance des neurites notamment (Arantes and Andrews, 2006), ou encore pour évacuer des composants non dégradés et potentiellement toxiques (Xu and Ren, 2015). La présentation d'antigènes peut aussi être réalisée par fusion du lysosome avec la membrane plasmique (Blott and Griffiths, 2002).

### 3) Importance des lysosomes pour les cellules et en particulier les neurones : exemple des maladies de surcharge des lysosomes (MSL) :

De par leur rôle prépondérant dans les voies de recyclage de composants cellulaires, d'élimination de composants potentiellement toxiques ou dans la réponse à différents stress cellulaires, les lysosomes sont des organites très importants pour la survie des cellules.

#### (a) Les maladies de surcharge des lysosomes (MSL) :

L'importance des lysosomes pour les cellules et pour l'organisme dans son ensemble est mise en évidence par la sévérité clinique d'un groupe de maladies héréditaires causées par des mutations affectant des fonctions lysosomales : les maladies de surcharge des lysosomes (MSL). Ces pathologies sont caractérisées par l'accumulation de macromolécules, le plus souvent des lipides, dans les systèmes endolysosomal et autophago-lysosomal (Vitner et al., 2010) (Figure 6). On en dénombre environ 50 différentes pour une incidence totale de 1/5000 naissances (un chiffre probablement sous-estimé). La majeure partie d'entre elles est causée par des mutations affectant la fonction d'enzymes lysosomales. Toutefois, un nombre considérable d'entre elles résulte de dysfonctions de protéines de la membrane des lysosomes n'ayant aucune activité enzymatique (Platt et al., 2012).

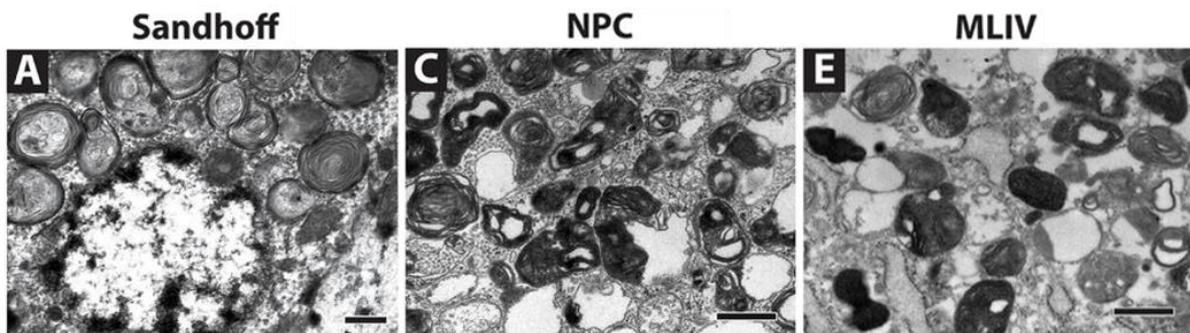


Figure 6 : Exemple d'accumulation de matériel, observée par microscopie électronique, dans des fibroblastes de peau prélevés sur des patients, pour 3 maladies de surcharge des lysosomes : (A) maladie de Sandhoff, (C) Niemann-Pick de type C et (E) Mucopolipidose de type IV. Barre d'échelle = 0,5µm. Adapté de (Morgan et al., 2011).

#### (i) Signes cliniques :

Les signes cliniques varient en fonction de la protéine déficiente, de la nature des macromolécules qui s'accumulent ou encore des organes affectés. L'accumulation de substrats non digérés dans les lysosomes a lieu dans plusieurs organes. Les organes touchés varient selon les gènes affectés. Il en résulte une importante variabilité clinique entre les différentes formes de MSL. On peut ainsi retrouver des symptômes dus à l'atteinte d'organes tels que le foie ou la rate, des déformations du squelette ou encore des symptômes neurologiques (Vitner et al., 2010). Classiquement les MSL

sont caractérisées par une neurodégénérescence qui débute au cours de l'enfance ou de l'adolescence mais certaines formes commencent plus tardivement. Les deux tiers des MSL ont une composante neurodégénérative, soulignant l'importance de la bonne fonction des lysosomes pour le système nerveux central (SNC) et en particulier pour les neurones. Les régions du SNC qui sont affectées sont souvent variables. Ceci peut s'expliquer par la sensibilité différente des divers sous-types de neurones, l'importance des accumulations dans les diverses régions du cerveau ainsi que par la nature des macromolécules qui s'accumulent et qui auront un impact différent sur les cellules (Platt et al., 2012).

(ii) Accumulation de lipides et mort neuronale : l'exemple de la maladie de Niemann-Pick de type C :

Dans les MSL la perte neuronale semble se produire généralement à des stades avancés de la pathologie suggérant que les premiers symptômes résultent de la mauvaise fonction de neurones plus que de leur mort. Cette dysfonction est induite par une succession d'évènements, qui varient en fonction du gène muté, et qui aboutit à la perturbation de plusieurs voies cellulaires dont la dégradation par les lysosomes. Dans un premier temps la mutation causale altère la bonne fonction des lysosomes amenant à l'accumulation primaire d'une ou quelques macromolécules, le plus souvent des lipides. Par exemple : le cholestérol et des sphingolipides s'accumulent dans la maladie de Niemann-Pick de type C tandis que le ganglioside GM2 s'accumule dans la maladie de Sandhoff (Sandhoff, 2012; Vanier, 2010). Ces accumulations primaires sont délétères pour les cellules et vont conduire le plus souvent à l'accumulation secondaire d'autres substrats dans les lysosomes ce qui peut participer à l'altération des fonctions des voies lysosomales.

Par exemple, dans la maladie de Niemann-Pick de type C (NPC) une accumulation primaire de cholestérol pourrait induire une accumulation secondaire du ganglioside GM2 (Trilck et al., 2017). D'un point de vue clinique cette pathologie est notamment caractérisée par une insuffisance hépatique et des signes neurologiques : démence, épilepsie, des troubles spastiques ou encore une ataxie (l'ataxie est une mauvaise coordination motrice qui résulte d'une atteinte du cervelet qui participe au contrôle des mouvements fins). Cette maladie est causée par des mutations dans les gènes *NPC1* ou *NPC2* qui codent pour des protéines impliquées dans le transport de cholestérol depuis la lumière des lysosomes vers d'autres organites. La protéine NPC2, localisée dans la lumière des lysosomes capte le cholestérol libre et l'amène à la protéine NPC1, située dans la membrane du lysosome. NPC1 participe ensuite au transfert du cholestérol depuis la membrane du lysosome vers d'autres membranes dont celle du réticulum endoplasmique (RE) ou encore celle des peroxysomes au niveau de contacts entre ces organites (Figure 7B) (Chu et al., 2015). Si l'une de ces protéines est non fonctionnelle le cholestérol n'est pas efficacement transporté des lysosomes vers les autres

organites et s'accumule. Les accumulations de cholestérol dans les lysosomes sont tellement importantes qu'elles permettent de différencier les cellules sauvages des cellules mutantes par un simple marquage du cholestérol (Figure 7A). De tels marquages sont d'ailleurs utilisés à des fins de diagnostic.

Les signes cliniques neurologiques typiquement retrouvés dans la maladie de Niemann-Pick de type C sont une déficience cognitive et une ataxie cérébelleuse (Cougnoux et al., 2016). Plusieurs études suggèrent que c'est bien l'accumulation du cholestérol dans les lysosomes et son trafic défectueux vers les autres organites cellulaires dans les neurones qui semblent être responsables de la neuropathologie mais les mécanismes impliqués ne sont pas encore bien établis. En effet, l'inactivation du gène *NPC1* uniquement dans les neurones induit les mêmes phénotypes qu'une inactivation globale du gène dans un modèle murin (Yu et al., 2011). L'expression de la protéine NPC1 seulement dans les neurones d'un modèle murin *NPC1<sup>-/-</sup>* suffit à prévenir la neurodégénérescence (Lopez et al., 2011). Prévenir les accumulations secondaires de gangliosides en croisant des souris *NPC1<sup>-/-</sup>* avec des souris déficientes pour la GM2 ou la GM3 synthase (enzymes impliquées dans la synthèse des gangliosides) permet de diminuer les accumulations de gangliosides mais ne permet pas d'améliorer les phénotypes neurodégénératif et clinique et la durée de vie des animaux (Li et al., 2008; Liu et al., 2008, 2000). Les souris *NPC1<sup>-/-</sup>/GalNAcT<sup>-/-</sup>* (le gène *GalNAcT* code pour l'enzyme responsable de la synthèse du GM2 et des gangliosides complexes) ont une réduction des accumulations de cholestérol dans le cerveau ainsi que des inclusions cytoplasmiques et des corps multilamellaires dans les neurones mais la démyélinisation et la perte des cellules de Purkinje du cervelet sont toujours présentes suggérant que l'accumulation du ganglioside GM2 n'est pas la cause principale des dysfonctions du SNC (Liu et al., 2000) même si cette accumulation pourrait aggraver celle du cholestérol. Les altérations du trafic du cholestérol dans les neurones semblent donc bien induire la neurodégénérescence dans la maladie de Niemann-Pick de type C. La cascade d'évènements suivant ces accumulations n'est à ce jour pas bien définie. Plusieurs altérations ont été observées, comme par exemple une neuroinflammation (Cologna et al., 2014), des dysfonctions des mitochondries (Kennedy et al., 2014), des problèmes dans le trafic axonal (Ohara et al., 2004) ou encore des altérations de l'homéostasie calcique des lysosomes (Lloyd-Evans et al., 2008). Mais des études complémentaires sont nécessaires pour déterminer si ces altérations contribuent vraiment à la mort neuronale ou sont seulement des effets secondaires de l'accumulation de cholestérol.

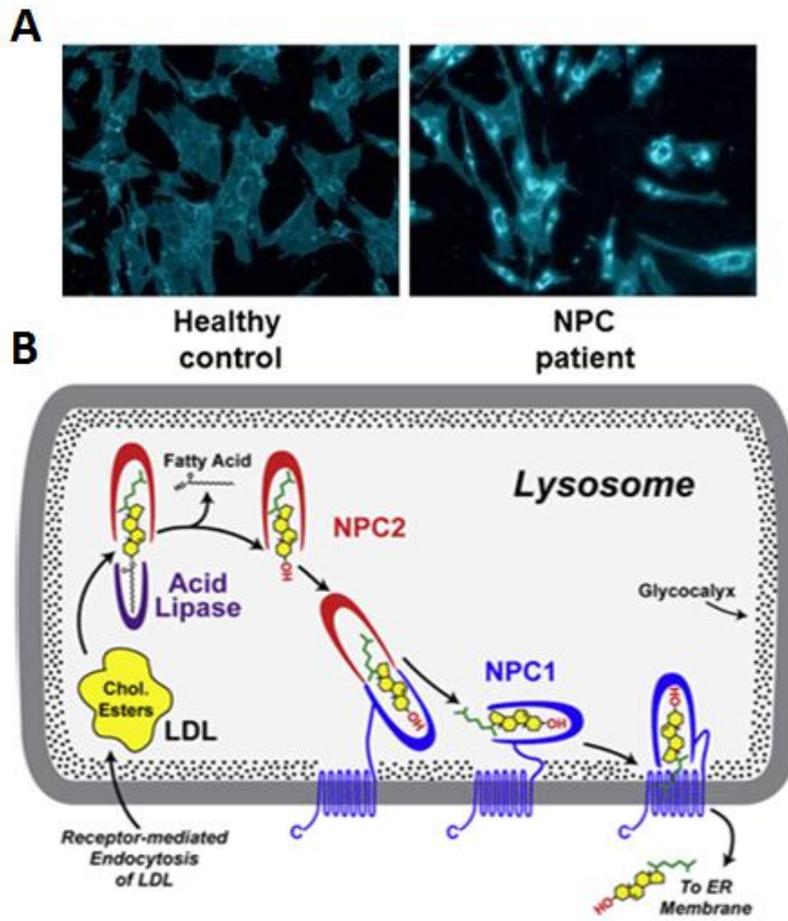


Figure 7 : Maladie de Niemann-Pick de type C. (A) Marquage du cholestérol par la filipin dans des fibroblastes contrôles (healthy control) et provenant d'un patient atteint par la maladie de Niemann-Pick de type C (NPC patient) (Sarig et al., 2013). (B) Rôle des protéines NPC1 et 2 dans le transport du cholestérol de la lumière des lysosomes vers leurs membranes (<http://addiandcassi.com/researchers>).

### (b) Voies cellulaires affectées dans les maladies de surcharges des lysosomes :

L'activité catalytique des lysosomes est impactée dans la très grande majorité des maladies de surcharge des lysosomes, résultant soit directement de la mutation d'un gène codant pour une enzyme ou de l'accumulation de macromolécules perturbant la bonne fonction de ces organites (Platt et al., 2012). Il en résulte des altérations de diverses voies cellulaires. Ces conséquences varient selon la nature des composés qui s'accumulent.

#### (i) L'homéostasie calcique

L'une des voies régulièrement affectée dans les maladies de surcharge des lysosomes est la régulation de l'homéostasie calcique (Lloyd-Evans and Platt, 2011). Ce processus est par ailleurs impliqué dans de nombreuses pathologies neurodégénératives (Mattson, 2007). Dans plusieurs MSL différentes les taux de calcium dans les lysosomes sont altérés, de même que la capacité de

stockage et/ou de relargage du calcium par les lysosomes. Les lysosomes sont capables de stocker des concentrations élevées de calcium (de l'ordre de 500 $\mu$ M) et utilisent la signalisation calcique pour de nombreuses fonctions (fusion, trafic, exocytose, etc.).

#### (1) Mucopolidose de type IV

Des mutations dans le gène *MCOLN1* codant pour le canal TRPML1 (nommé aussi mucolipin 1) sont responsables de la mucopolidose de type IV. Cette maladie rare est caractérisée par un retard psychomoteur qui apparaît le plus souvent au cours de la première année de vie. Des troubles ophtalmologiques font aussi partie des signes cliniques les plus fréquemment observés chez les patients (Sun et al., 2000). Les signes neurologiques qui peuvent être retrouvés chez les patients sont peu spécifiques de la pathologie ce qui peut aboutir à de mauvais diagnostics. Certains patients se sont vus diagnostiqués une infirmité motrice cérébrale ou encore une paraplégie spastique (Bindu et al., 2008). Une variété importante d'espèces lipidiques s'accumule dans les cellules des patients : des mucopolysaccharides, des phospholipides, du cholestérol ou encore des gangliosides, alors que les accumulations dans le système nerveux central sont majoritairement composées de lipides contenant des acides sialiques (Bach, 2001). Dans cette pathologie le canal calcique TRPML1 est dysfonctionnel, impactant directement l'homéostasie calcique du lysosome. TRPML1 est impliqué dans le trafic des lysosomes, dans la fusion de ces organites avec des phagosomes ou autophagosomes (Dayam et al., 2015), ainsi que dans la tubulation des lysosomes (Li et al., 2016) (Figure 8).

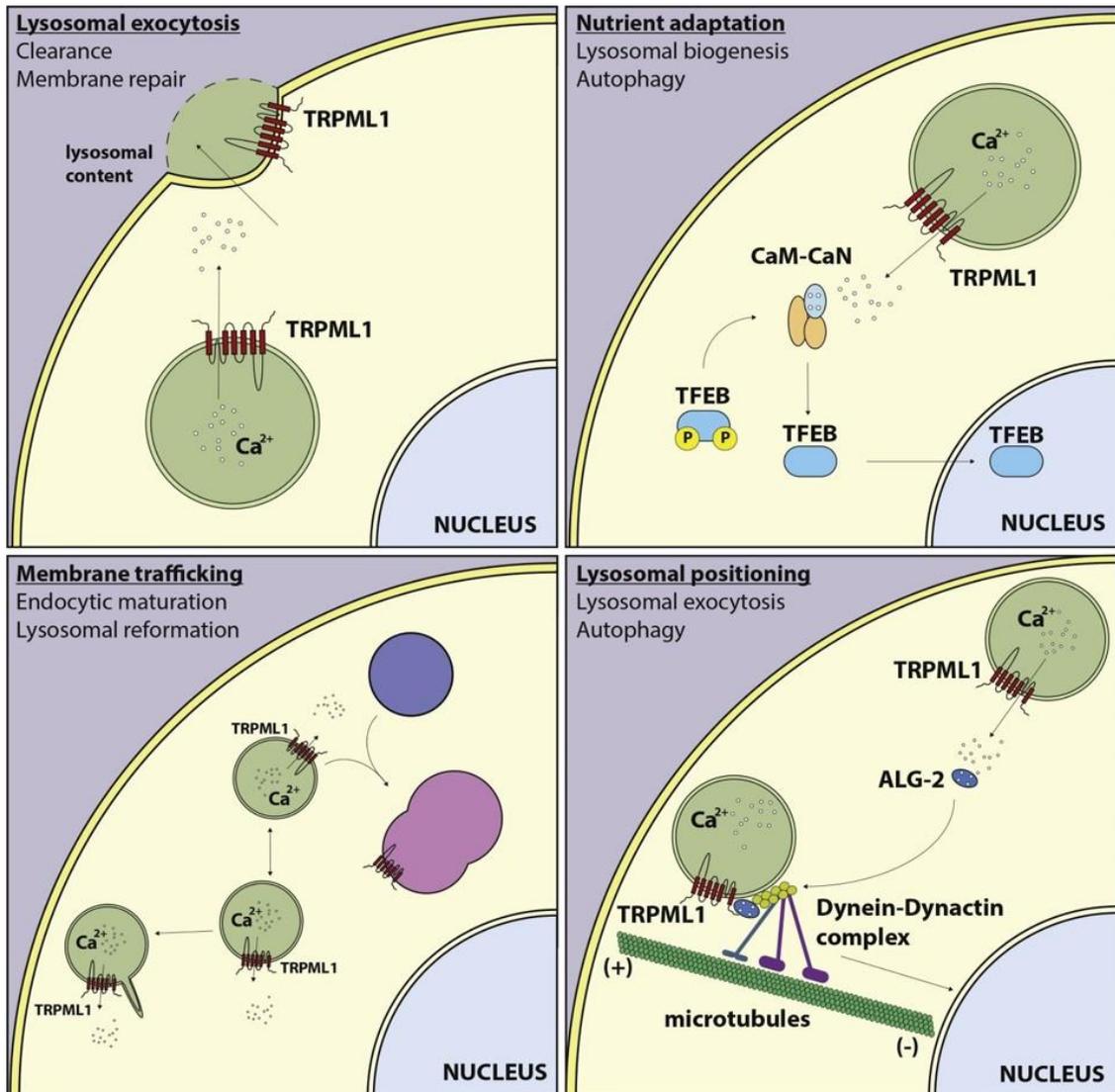


Figure 8 : Différents rôles du canal calcique des lysosomes TRPML1. La libération de calcium par TRPML1 est impliquée dans des fonctions variées comme l'exocytose des lysosomes, l'adaptation à des privations en nutriments (exemple déjà présenté en figure 5), la fusion avec d'autres vésicules ou encore le trafic des lysosomes (Di Paola et al., 2017).

## (2) Niemann-Pick de type C :

La maladie de Niemann-Pick de type C, due à des mutations dans les gènes *NPC1* et *NPC2* a été la première à être associée à un problème d'absorption de calcium par les lysosomes qui semble être induit par l'accumulation secondaire de sphingosine dans les lysosomes (Lloyd-Evans et al., 2008). La libération de calcium des lysosomes induite par le NAADP (Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate), qui active le canal TPC2, est aussi fortement réduite. On estime que les taux de calcium dans les lysosomes des cellules de patients sont réduits de moitié environ (Lloyd-Evans et al., 2008). De manière intéressante, la libération de calcium par les lysosomes est impliquée dans la fusion des lysosomes avec les endosomes, un processus perturbé dans les cellules NPC. On peut aussi noter que la perturbation du trafic du cholestérol des lysosomes vers les autres organites pourrait avoir

un impact sur la régulation des taux de calcium dans la cellule. En effet, il a été démontré que le cholestérol participe directement à la modulation d'un mécanisme ubiquitaire de captation de calcium extracellulaire : le « Store Operated Calcium Entry » (SOCE) (Figure 9). En réponse à des diminutions des taux de calcium dans le réticulum endoplasmique ce processus est activé pour permettre l'entrée de calcium dans la cellule, qui sera ensuite importé dans le RE (Smyth et al., 2010). Ce mécanisme est aussi utilisé pour déclencher des voies de signalisation. Les protéines impliquées dans le SOCE, STIM1 et le canal calcique Orai1, possèdent des domaines de liaison au cholestérol (Derler et al., 2016; Pacheco et al., 2016). Ces interactions jouent un rôle dans l'inhibition du phénomène pour éviter une surcharge de calcium dans la cellule. Toutefois, une altération du SOCE n'a jusqu'à présent jamais été mise en évidence dans des modèles NPC. Plus récemment, il a été montré que le principal canal calcique des lysosomes, TRPML1, est inhibé par l'accumulation de lipides observée dans la maladie NPC, jouant un rôle dans la dérégulation de l'homéostasie calcique (Shen et al., 2012). Toutefois, l'impact de cette inhibition sur le contenu en calcium des lysosomes n'est pas bien défini. Les taux de calcium étant réduits dans les cellules de patients atteints par la maladie de Niemann-Pick de type C et augmentés chez les patients touchés par la mucopolysaccharidose de type IV (résultant de la perte de fonction de TRPML1).

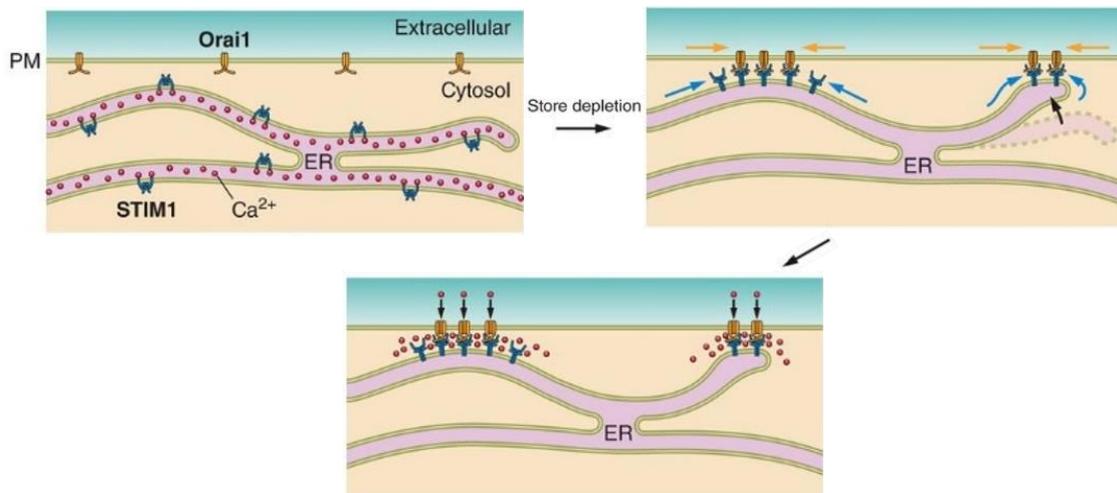


Figure 9: Store Operated Calcium Entry (SOCE). La protéine STIM1, en réponse à des diminutions des taux de calcium dans le RE, change de conformation et va activer le canal calcique Orai1 au niveau de zone de contact entre le RE et la membrane plasmique (PM). Adapté de (Prakriya and Lewis, 2015).

### (3) Syndrome de Chediak-Higashi :

Une autre maladie de surcharge des lysosomes dans laquelle on retrouve une altération de la régulation de l'homéostasie calcique est le syndrome de Chediak-Higashi. Cette pathologie autosomique récessive est causée par des mutations dans le gène *LYST/CHS1* qui code pour la protéine LYST (Shiflett et al., 2002). Cette protéine pourrait jouer un rôle dans le trafic et dans la fusion et fission des lysosomes (Sepulveda et al., 2015; de Souza et al., 2017). La fonction de LYST

semble cruciale pour le système immunitaire puisque les patients souffrent d'infections récurrentes, la sécrétion de granules lytiques par les lymphocytes T est altérée ainsi que le bon fonctionnement des plaquettes entraînant des saignements anormaux (Buchanan and Handin, 1976). Des atteintes neurologiques qui peuvent varier selon les patients apparaissent à l'âge adulte si ces derniers sont toujours en vie (la maladie est souvent fatale au cours de l'enfance) (Rihani et al., 2012). On observe des neuropathies périphériques, une dégénérescence du cervelet, des épilepsies et une paraplégie spastique. La présence de lysosomes anormalement élargis a été observée dans les cellules. Des neutrophiles, provenant d'un modèle murin de la pathologie, présentent des lysosomes dont l'absorption de calcium est augmentée (Styrt et al., 1988). Cette augmentation pourrait découler d'une expression plus importante de pompes  $\text{Ca}^{2+}$ , dont l'identité moléculaire est toujours inconnue, à la surface des lysosomes. Les mécanismes physiopathologiques en cause restent donc à identifier.

#### (4) Homéostasie calcique du réticulum endoplasmique dans les MSL :

Les trois exemples décrits précédemment sont caractérisés par des défauts de l'homéostasie calcique lysosomale. L'homéostasie calcique du RE, le principal réservoir de calcium dans la cellule, est également affectée dans certaines maladies de surcharge des lysosomes et en particulier dans celles où l'accumulation de sphingolipides est présente telles que : la maladie de Gaucher, les gangliosidoses à GM1 et GM2 et la maladie de Niemann-Pick de type A (Ginzburg and Futerman, 2005). Les mécanismes aboutissant à la perturbation de l'homéostasie calcique du réticulum endoplasmique varient en fonction des pathologies mais résulteraient de l'efflux des espèces lipidiques (glucosylceramide, GM1, GM2 ou encore sphingomyeline) qui s'accumulent dans les lysosomes vers le RE (Vitner et al., 2010). Par exemple, dans un modèle murin de la gangliosidose à GM1, le ganglioside GM1 s'accumule au niveau des membranes associées aux mitochondries (MAMs) et perturbe la fonction du récepteur à l'IP3 de type 1 (canal de libération du  $\text{Ca}^{2+}$  du RE vers le cytosol) induisant une surcharge de calcium dans les mitochondries ce qui altère leurs fonctions (Sano et al., 2009). On peut noter qu'une augmentation des taux de calcium dans le cytosol est retrouvée dans ces pathologies (Vitner et al., 2010).

Ainsi, l'homéostasie calcique est perturbée dans de nombreuses maladies de surcharge des lysosomes. Ces altérations peuvent être primaires (ML IV) ou secondaires aux problèmes de métabolisme des lipides et participent à la physiopathologie. Toutefois, l'importance de ces dérégulations est très probablement différente pour chacune de ces maladies.

## (ii) L'endocytose :

Les lysosomes ont un rôle central dans le traitement et l'élimination de substrats provenant de différentes voies, dont celles de l'endocytose. La dégradation des composés extracellulaires ou de la membrane plasmique incorporés par endocytose est effectuée par les lysosomes. Cela peut avoir lieu par des échanges entre endosomes et lysosomes via des contacts de type « Kiss and Run » ou par une fusion complète entre les deux vésicules (Figure 3B) (Bright et al., 1997, 2005; Mullock et al., 1998). Ces mécanismes participent au métabolisme cellulaire puisque les cellules vont capter un grand nombre de nutriments dans le milieu extracellulaire par endocytose. Dans les MSL les accumulations de macromolécules dans les lysosomes peuvent perturber les fonctions d'autres protéines, comme des enzymes ou des protéines impliquées dans l'efflux des monomères et/ou macromolécules des lysosomes et endo-lysosomes. Il en résulte une accumulation secondaire (Platt et al., 2012). Les accumulations primaires et secondaires peuvent entraîner la dérégulation d'autres processus cellulaires parmi lesquels l'endocytose.

Des altérations de l'endocytose, du trafic des endosomes, de leur fusion avec les lysosomes ainsi que du contenu des endo-lysosomes sont retrouvées dans des MSL. Une étude récente conduite sur quatre modèles de MSL différents (Niemann-Pick de type A, Niemann-Pick de type C, maladie de Fabry et maladie de Gaucher) a montré que différentes voies d'endocytose (dont l'endocytose dépendante de la clathrine) sont dérégulées (Rappaport et al., 2016) (Figure 10A et B). De manière intéressante, ces défauts sont corrélés aux niveaux d'accumulations de cholestérol dans les cellules (Figure 10C). Les raisons de ces problèmes d'endocytose sont encore à identifier mais pourraient être la conséquence de l'accumulation, primaire ou secondaire, de macromolécules dans les lysosomes qui perturbe la fonction de protéines impliquées dans la signalisation, la formation du manteau de clathrine, les événements de fission/fusion ou encore le trafic de ces organites (Rappaport et al., 2016).

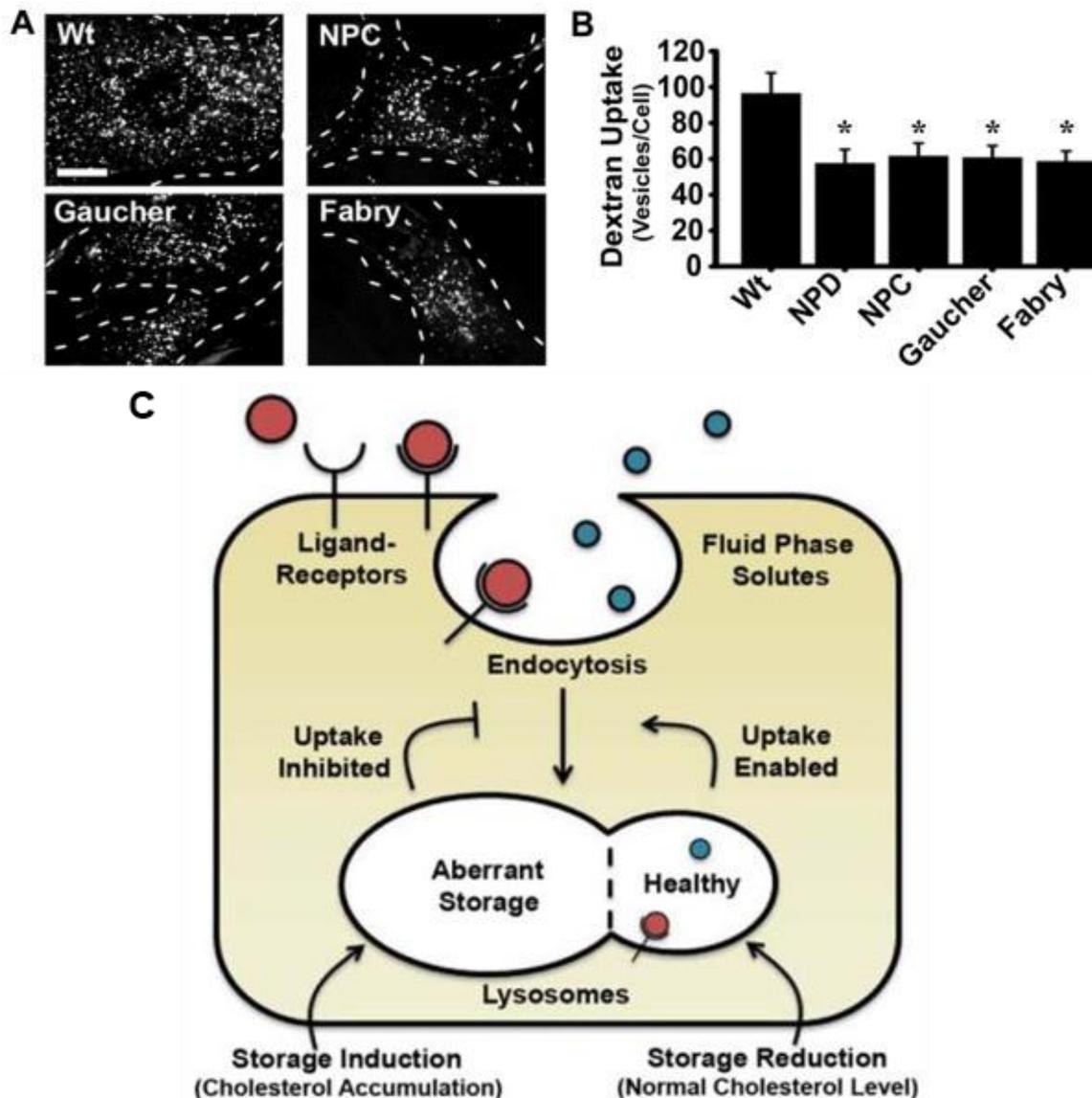


Figure 10 : Exemple d'altération de l'endocytose dans les MSL. (A et B) : Evaluation de l'endocytose du dextran dans des fibroblastes de peau de patients atteints de MSL. (C) Schéma des altérations de l'endocytose dans les MSL, les défauts d'endocytose semblent être corrélés aux niveaux d'accumulations du cholestérol. Adapté de (Rappaport et al., 2016).

La diminution de l'efflux de monomères des endo-lysosomes est observée dans des MSL (Platt et al., 2012) ce qui peut conduire à des problèmes métaboliques. Les dérégulations de l'endocytose peuvent aussi avoir des conséquences sur un grand nombre d'autres voies cellulaires comme par exemple la transduction de signaux, la dégradation de pathogènes ou encore l'autophagie (Rappaport et al., 2016).

### (iii) L'autophagie :

Les surcharges de métabolites dans les lysosomes observées dans les MSL affectent donc leurs fonctions. Les lysosomes étant impliqués dans le processus autophagique, dans la majorité des MSL le flux autophagique est diminué (Ballabio, 2009; Raben et al., 2009). Ce flux est défini par la vitesse à laquelle les substrats autophagiques sont éliminés par la cellule. Cette diminution est mise en évidence par une accumulation d'autophagosomes (vésicules marquées par la protéine p62, qui reconnaît les substrats ubiquitinylés à éliminer par autophagie et/ ou par la protéine LC3-II qui est présente au niveau de la membrane des autophagosomes) et d'autolysosomes, qui résultent de la fusion entre lysosomes et autophagosomes. La voie de l'autophagie qui semble la plus touchée dans les MSL est la macroautophagie, mais peut-être parce que c'est la mieux connue et la plus étudiée. Toutefois les autres formes d'autophagie peuvent être impactées elles aussi.

Par exemple, l'autophagie médiée par les protéines chaperonnes est perturbée dans la maladie de Danon qui est induite par des mutations dans le gène codant pour la protéine Lamp2 (Fidziańska et al., 2007). Pour cette forme d'autophagie, les protéines cytosoliques à dégrader sont reconnues par des protéines chaperons qui les amènent ensuite aux lysosomes où elles lient la protéine Lamp2 située sur la membrane externe du lysosome. Les protéines cibles subissent une translocation jusque dans la lumière du lysosome où elles sont dégradées par des hydrolases. La protéine Lamp2 est donc essentielle au bon fonctionnement de ce processus et l'activité de ce type d'autophagie semble être corrélée à l'expression de la protéine (Schneider and Cuervo, 2013).

Comme les lysosomes interviennent à l'étape finale de dégradation par autophagie il n'est pas surprenant de voir que toutes les formes d'autophagie sont impactées. En effet, l'activité catalytique des lysosomes est impactée dans la très grande majorité des maladies de surcharge des lysosomes (Platt et al., 2012). Il a ainsi été noté que l'activité protéolytique des lysosomes est diminuée dans les lysosomes de fibroblastes de peau provenant des patients souffrant de mucopolysaccharidose de type I et IV ou encore de la gangliosidose à GM1, même si aucune de ces pathologies n'est causée par des déficiences génétiques en protéases (Kopitz et al., 1993). En conséquence de la diminution d'activité catalytique des lysosomes, il est attendu que la dégradation de substrats par autophagie soit elle aussi perturbée. Une conséquence de cette perturbation peut-être l'accumulation d'autolysosomes. Dans plusieurs cas l'altération du processus autophagique est causée, au moins en partie, par des problèmes dans la fusion des autophagosomes avec les lysosomes. C'est par exemple le cas dans des fibroblastes d'un modèle murin de la mucopolysaccharidose de type IIIA dans lesquels la fusion entre les autophagosomes et lysosomes est perturbée par l'accumulation de cholestérol dans les lysosomes (Fraldi et al., 2010). Ces accumulations entraînent une expansion des membranes enrichies en cholestérol dans les lysosomes, ce qui empêche la fusion, notamment

en bloquant l'assemblage et le recyclage de certaines protéines SNARE (Figure 3B) (Fraldi et al., 2010). L'une des étapes finales du processus autophagique, la reformation des lysosomes, est aussi perturbée dans plusieurs MSL dont la maladie de Fabry (Yu et al., 2010). Ce processus sera détaillé plus tard dans l'introduction.

Ces atteintes de la capacité autophagique des cellules ont donc des conséquences délétères pour les cellules. Deux exemples résultant de la diminution du flux autophagique sont la persistance de mitochondries et/ou de peroxysomes endommagés et le changement de l'équilibre protéique cytoplasmique (Platt et al., 2012). Ces défauts sont délétères pour les cellules et en particulier pour les neurones qui semblent particulièrement sensibles à ces altérations (Nixon, 2013).

#### **4) Importance de l'autophagie pour les neurones :**

L'autophagie est un processus physiologique nécessaire au bon fonctionnement des neurones et sa dérégulation peut être associée à des processus neurodégénératifs.

##### **(a) Effet neuroprotecteur :**

L'effet neuroprotecteur de l'autophagie a été mis en évidence par des études de l'invalidation, spécifiquement dans les neurones, de certains gènes clefs de l'autophagie. En effet, si chez la souris l'invalidation globale de la majorité des gènes clefs de l'autophagie est responsable d'une létalité embryonnaire ou néonatale (Mizushima and Levine, 2010), l'invalidation spécifiquement dans les neurones des gènes *Atg5*, *Atg7* ou encore de *Fip200* (gènes codant pour des protéines impliquées notamment dans la formation des autophagosomes) induit un phénotype neurodégénératif et l'accumulation de p62 (Hara et al., 2006; Komatsu et al., 2006, 2007; Liang et al., 2010).

Cet effet neuroprotecteur pourrait être lié au rôle de l'autophagie dans l'élimination et le recyclage des organites et macromolécules défectueuses ainsi que dans la prévention de l'accumulation de protéines toxiques dans le cytoplasme des neurones (Nixon, 2013). Leur incapacité à se diviser rend impossible la dilution de ces éléments cellulaires par mitose. Les neurones sont donc particulièrement vulnérables à des diminutions du flux autophagique.

L'une des caractéristiques communes des maladies neurodégénératives est par ailleurs l'accumulation pathologique d'agrégats protéiques qui sont toxiques pour les cellules comme par exemple dans la maladie d'Alzheimer (agrégats intra cytoplasmique de la protéine tau (De Strooper and Karran, 2016)) ou encore la maladie de Parkinson (présence d'inclusions au sein du cytoplasme appelées corps de Lewy (Spillantini et al., 1998)).

Un bon fonctionnement des voies autophagiques est ainsi crucial pour la survie et la bonne fonction des neurones. Par ailleurs, l'activation de l'autophagie est proposée comme une cible thérapeutique prometteuse qui est de plus en plus étudiée (Menzies et al., 2017).

### (b) Altérations/dérégulations de l'autophagie dans les maladies neurodégénératives :

Des altérations de l'autophagie sont retrouvées dans la plupart des maladies neurodégénératives (Menzies et al., 2017; Nah et al., 2015; Nixon, 2013) (Figure 11).

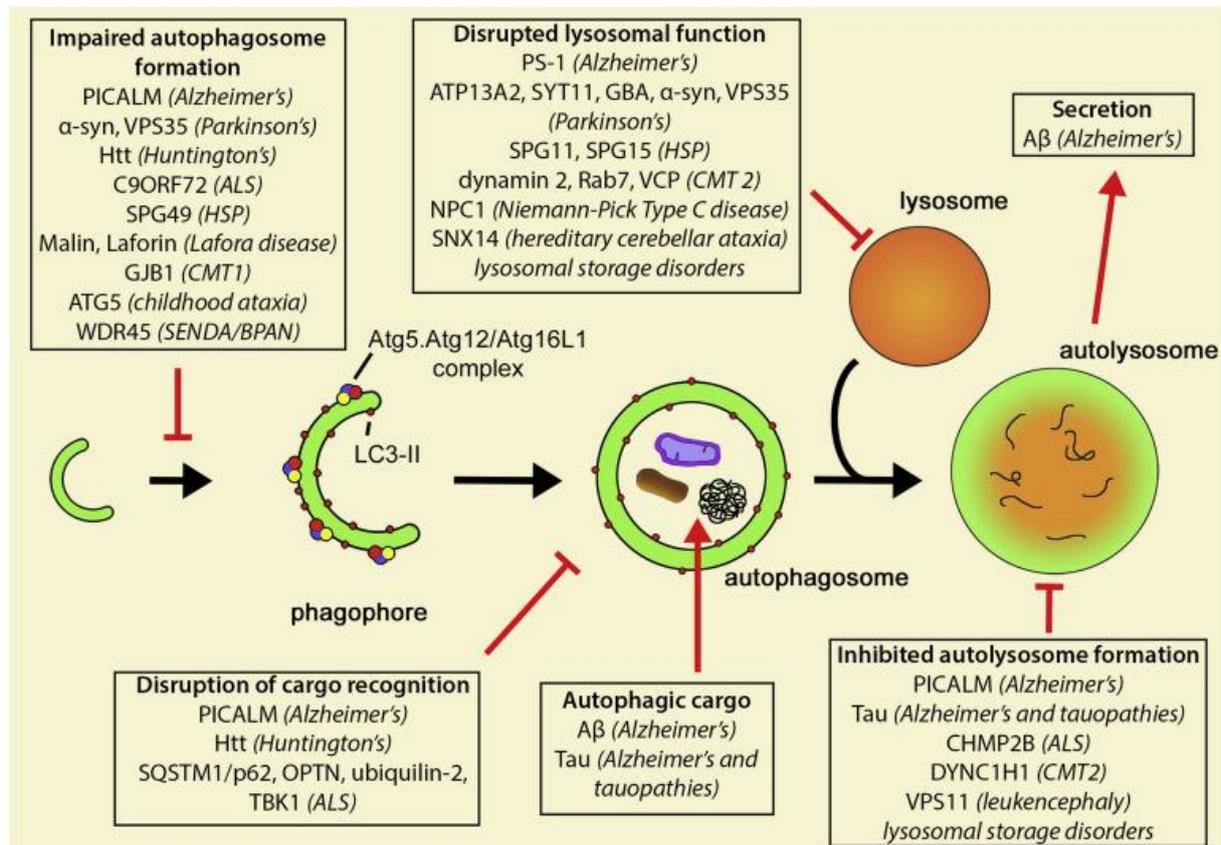


Figure 11 : Différentes altérations de l'autophagie dans des maladies neurodégénératives. Les protéines codées par de nombreux gènes associés à des pathologies neurodégénératives sont impliquées dans le processus autophagique. Le niveau d'action de ces protéines, et leurs maladies associées (marquées entre parenthèses), sont indiqués sur ce schéma. (Menzies et al., 2017).

#### (i) Activation trop importante ou mal régulée de l'autophagie : effet délétère

Une activation trop importante ou mal régulée de l'autophagie peut être en cause, par exemple quand l'activité de dégradation surpasse l'activité de biosynthèse ou de par le rôle de l'autophagie dans le processus d'apoptose (Cherra and Chu, 2008). Des composants essentiels à la cellule pourraient être dégradés, perturbant certaines fonctions cellulaires. Plusieurs études ont montré une activation augmentée de l'autophagie, dans des modèles de la maladie d'Alzheimer où le

peptide A $\beta$  pourrait induire la formation d'autophagosomes via l'activation de la voie AMPK (Son et al., 2012).

Une activation pathologique de l'autophagie est décrite dans d'autres maladies ou modèles de neurodégénérescence, comme des modèles d'ischémie cérébrale induite par hypoxie ou des modèles de toxicité induite par la 6-hydroxydopamine qui cible les neurones dopaminergiques. Cette suractivation de l'autophagie implique une action de la voie mTOR (Nixon, 2013).

Une induction accrue de l'autophagie est relativement fréquente dans des maladies neurodégénératives, même lorsque la dégradation des substrats dans les autolysosomes est altérée. Dans les MSL, une activation de l'autophagie a été reportée, entre autres, pour les maladies de Sandhoff, Niemann-Pick de type C, Pompe, gangliosidose à GM1, ou encore la mucopolysaccharidose de type IIIA (Vitner et al., 2010). Dans certains cas, ces défauts sont dus à une suractivation de l'autophagie (gangliosidose à GM1 ou maladie de Niemann-Pick de type C) tandis que pour les autres cas ils pourraient découler de défauts de fusion des lysosomes avec les autophagosomes (Vitner et al., 2010). Il est délicat de déterminer si les augmentations de l'activation de l'autophagie participent à la physiopathologie ou si elles sont induites en tant que mécanisme compensatoire, l'autophagie ayant un rôle neuroprotecteur dans un grand nombre de cas (Nixon, 2013).

#### (ii) Blocage ou inhibition des voies d'autophagie :

Le plus souvent ce sont des problèmes d'activation insuffisante de l'autophagie ou des dysfonctions causées par des altérations de la fonction lysosomale qui sont en cause dans ces pathologies (Nixon, 2013). Ceci est en accord avec le rôle neuroprotecteur de l'autophagie. Ainsi il a été récemment rapporté qu'une mutation faux sens dans le gène *ATG5* chez l'homme est responsable d'une ataxie et d'un retard mental (Kim et al., 2016). Le produit de ce gène joue un rôle très important dans la formation des autophagosomes (Figure 11). Une mitophagie déficiente est également en cause dans des formes familiales de la maladie de Parkinson. Des mutations dans les gènes *PARK2* et *PINK1* sont impliquées dans des formes familiales de la maladie de Parkinson (Nuytemans et al., 2010). Ces gènes codent respectivement pour l'ubiquitine-ligase parkine et la sérine/thréonine kinase PINK1 qui jouent un rôle important dans la mitophagie ; le processus de recyclage des mitochondries déficientes par autophagie (Bertolin et al., 2013; Matsuda et al., 2010; Vives-Bauza et al., 2010). Quand les gènes codant pour ces protéines sont mutés, la mitophagie est perturbée ce qui entraîne la persistance de mitochondries dysfonctionnelles au sein de la cellule (Bertolin et al., 2013). Une mauvaise induction de l'autophagie semble aussi être en cause dans la maladie de Huntington. En effet, dans cette pathologie des oligomères toxiques composés de la protéine

huntingtine mutée s'agrègent dans le cytoplasme. La huntingtine mutée perturbe la reconnaissance des substrats autophagiques par les autophagosomes (Figure 11) (Martinez-Vicente et al., 2010). L'activation de l'autophagie en est alors affectée. La protéine huntingtine sauvage pourrait participer au recrutement de plusieurs protéines clés lors de l'autophagie sélective de protéines ou organites (Ochaba et al., 2014; Rui et al., 2015). Ces exemples soulignent que des perturbations de l'autophagie sont impliquées dans le processus neurodégénératif et mettent en évidence son rôle crucial dans la survie des neurones.

Des dysfonctions lysosomales, comme celles observées dans les maladies de surcharge des lysosomes peuvent à elles seules perturber l'autophagie (Platt et al., 2012). Pour assurer le bon fonctionnement de l'autophagie il est nécessaire pour les cellules de maintenir un réservoir de lysosomes fonctionnels tout au long de leurs vies. Or, les lysosomes sont consommés lors des processus de dégradation, dont celui de l'autophagie. Des études récentes ont mis en évidence des mécanismes cellulaires dont la fonction est de recycler les membranes des lysosomes pour reformer des lysosomes capables de réaliser leurs fonctions catalytiques (Figure 12).

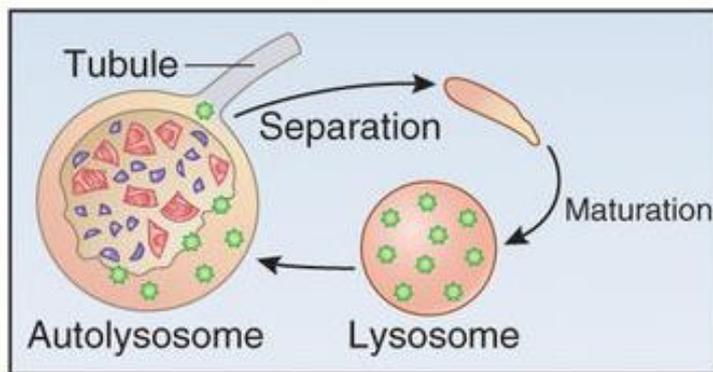


Figure 12 : Reformation des lysosomes après dégradation des substrats autophagiques contenus dans l'autolysosome. Ce processus fait intervenir une tubulation de la membrane de l'autolysosome (Nixon, 2013).

### 5) La reformation des lysosomes après autophagie :

Lors de l'autophagie, la fusion des autophagosomes avec les lysosomes consomme une grande partie des lysosomes. Des mécanismes permettant de retourner les cellules en lysosomes matures sont alors nécessaires. La reformation des lysosomes à partir d'organites hybrides (endo-lysosomes et autophagosomes) avait été postulée peu de temps après leur découverte (De Duve and Wattiaux, 1966). Les premières expériences mettant en évidence ce processus ont été réalisées à la fin des années 1990 et montrent que les lysosomes peuvent être reformés à partir d'organites hybrides et être réutilisés pour des cycles de fusion et de reformation ultérieurs (Bright et al., 1997). La reformation des lysosomes requiert de l'ATP ainsi que le pH acide des lysosomes lui-même maintenu par l'action de la V-ATPase (Pryor et al., 2000).

### (a) L'« autophagic lysosome reformation » (ALR) :

C'est plus récemment que le mécanisme de reformation des lysosomes à partir d'autolysosomes a été décrit (Yu et al., 2010). C'est l'« Autophagic lysosome reformation » (ALR). Une fois que le contenu des autophagosomes est efficacement dégradé, la reformation de nouveaux lysosomes se déroule. La caractéristique la plus flagrante de cette reformation est la formation d'un tubule qui émerge de l'autolysosome (Figure 13).

Ces tubules sont uniquement formés de constituants membranaires des lysosomes, permettant leur recyclage (Sridhar et al., 2013; Yu et al., 2010).

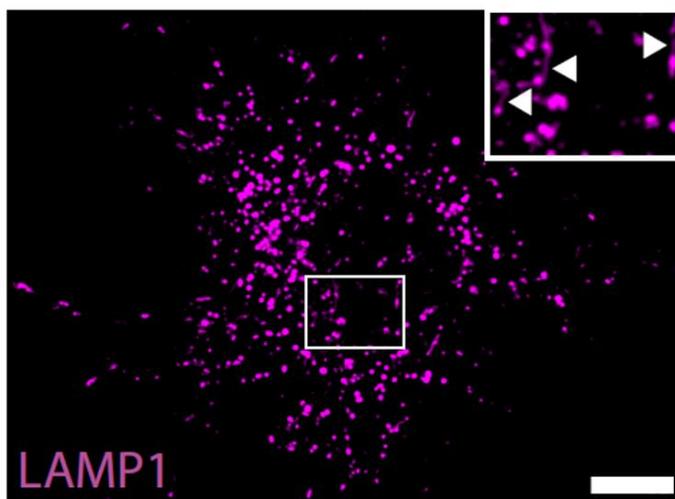
Suite à une étape de fission, des lysosomes immatures (proto-lysosomes) émergent des tubules (Figure 14). Ces organites nouvellement formés sont caractérisés par un pH neutre et l'absence d'enzymes ou de protéines de la lumière des lysosomes (Yu et al., 2010).

En mûrissant ils s'acidifient et acquièrent des protéines de la lumière des

lysosomes, devenant ainsi fonctionnels. L'ALR est conservée au cours de l'évolution et dans plusieurs types cellulaires (Rong et al., 2011; Yu et al., 2010) mais n'a encore jamais été étudiée dans des neurones.

#### (i) Initiation de l'ALR :

Suite à la présence d'un stress, une déprivation en acides aminés par exemple, l'autophagie est déclenchée. L'un des événements crucial est l'inhibition de la protéine mTOR (Yu et al., 2010). Ceci conduit à l'activation par déphosphorylation de protéines impliquées dans la formation des autophagosomes. Une fois formés, les autophagosomes, qui contiennent les composants cellulaires à dégrader, fusionnent avec des lysosomes. Quand la dégradation de leur contenu est effectuée par l'action des hydrolases lysosomales, la protéine mTOR est réactivée, ce qui est requis pour le déclenchement de l'ALR (Rong et al., 2011; Yu et al., 2010; Zhang et al., 2016). La perte de la protéine Spinster, qui pourrait être une perméase lysosomale ou un transporteur de sucres, bloque l'ALR (Rong et al., 2011), probablement en perturbant la bonne dégradation des composants de l'autolysosome, ce qui empêche la réactivation de mTOR.



**Figure 13 : Tubulation de lysosomes. Image de fibroblaste de souris exprimant la protéine lysosomale Lamp1 couplée à la mCherry. L'encart montre des lysosomes desquels émanent des tubules (têtes de flèches). Barre d'échelle = 10µm**

La phosphatidylinositol 4 kinase PI4KIII $\beta$ , qui produit le PI(4)P au niveau des lysosomes participe à l'ALR de manière coordonnée avec les PIP5K (Sridhar et al., 2013). La conversion des phosphoinositides PI(4)P en PI(4,5)P<sub>2</sub>, au niveau de la membrane des autolysosomes, par les kinases PIP5K1A et PIP5K1B permet le recrutement de la clathrine via le complexe protéique AP-2 et probablement aussi le complexe AP-4 (Rong et al., 2012). L'assemblage du réseau de clathrine, associé à d'autres protéines, induit une courbure de la membrane qui participe à la formation de sa vésiculation ainsi que l'initiation de la tubulation de la membrane. Le schéma de l'ensemble du processus est représenté en Figure 14.

(ii) Elongation des tubules :

Le mécanisme d'élongation des tubules n'est pas clairement établi. Il a été proposé que l'assemblage de molécules de clathrine entraîne le recrutement de molécules supplémentaires du complexe AP-2 qui recrutent à leur tour des PI(4,5)P<sub>2</sub> amplifiant le phénomène (Chen and Yu, 2017). Les microdomaines enrichis en PI(4,5)P<sub>2</sub> sont formés et assurent le recrutement de moteurs protéiques, les kinésines. La kinésine KIF5B interagit avec les PI(4,5)P<sub>2</sub> et fournit la force nécessaire pour former les tubules à partir des bourgeonnements de membranes formés par la clathrine (Du et al., 2016) (Figure 14). Une reconstitution *in vitro* de la tubulation d'autolysosomes a été réalisée en utilisant des purifications d'autolysosomes et de la protéine KIF5B (Du et al., 2016).

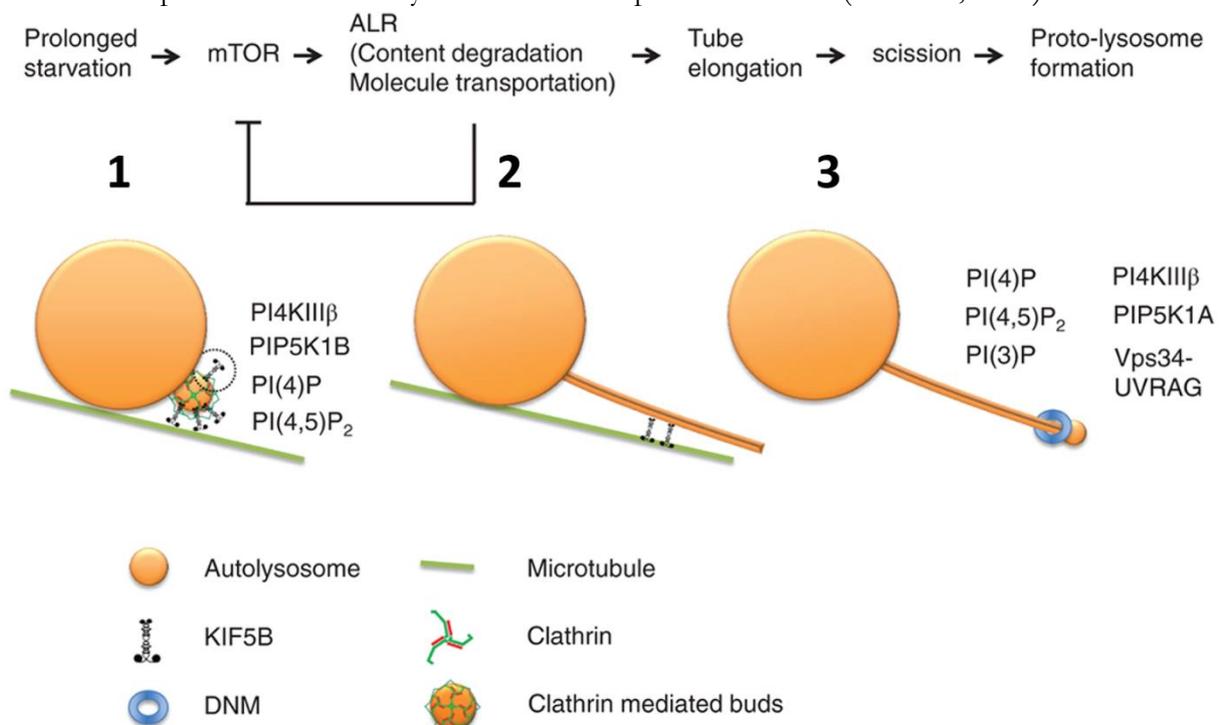


Figure 14 : Schéma de l'ALR. (1) Le bourgeonnement de la membrane de l'autolysosome est médié par la clathrine qui est recrutée par les complexes AP-2 et AP-4 (non représenté ici) eux-mêmes recrutés par la conversion de phosphoinositides. (2) L'élongation qui permet la formation du tubule est effectuée par l'action de moteurs protéiques comme la KIF5B. (3) La scission du proto-lysosome est réalisée par la dynamine 2 (DNM). (Chen and Yu, 2017).

### (iii) Scission des tubules et libération de lysosomes immatures :

Les proto-lysosomes sont générés à partir de l'extrémité des tubules et en sont libérés par un phénomène de scission. Ce processus semble impliquer des PI(4,5)P<sub>2</sub> produit par PIP5K1A (Rong et al., 2012). La scission ferait intervenir des mécanismes moléculaires similaires à ceux présents dans l'endocytose médiée par la clathrine. En effet, une étude a mis en évidence que la libération de nouveaux lysosomes immatures (proto-lysosomes) à partir des tubules est réalisée par une scission médiée par la dynamine 2 (Figure 14) (Schulze et al., 2013). Les tubules et les proto-lysosomes ne contiennent pas (ou très peu) de protéines de la lumière des lysosomes ce qui implique qu'une machinerie de rétention empêche de telles protéines de se retrouver dans les tubules. En absence de PI4KIIIβ, les protéines de la lumière pénètrent dans le tubule de reformation ce qui suggère que cette protéine est impliquée dans la machinerie de rétention (Sridhar et al., 2013). De plus l'absence de PI4KIIIβ induit un phénomène de tubulation exacerbé. Il a été proposé que ce phénomène soit dû à un effet anti-tubulation de la protéine ou du PI(4)P (Figure 15). La régulation des niveaux des différents phosphoinositides impliqués dans l'ALR pourrait ainsi être très importante mais les mécanismes ne sont pas précisément connus.

### (iv) ALR par vésiculation :

Dans des conditions basales, en absence de stress autophagique par exemple, il a été proposé que la reformation des lysosomes intervienne par des vésiculations discrètes médiées par la clathrine. PI4KIIIβ semble importante pour réguler ce processus, notamment en participant à la bonne organisation des molécules de clathrine qui participent au bourgeonnement des vésicules (Sridhar et al., 2013) (Figure 15). La tubulation des autolysosomes serait ainsi amplifiée dans des conditions de stress autophagiques.

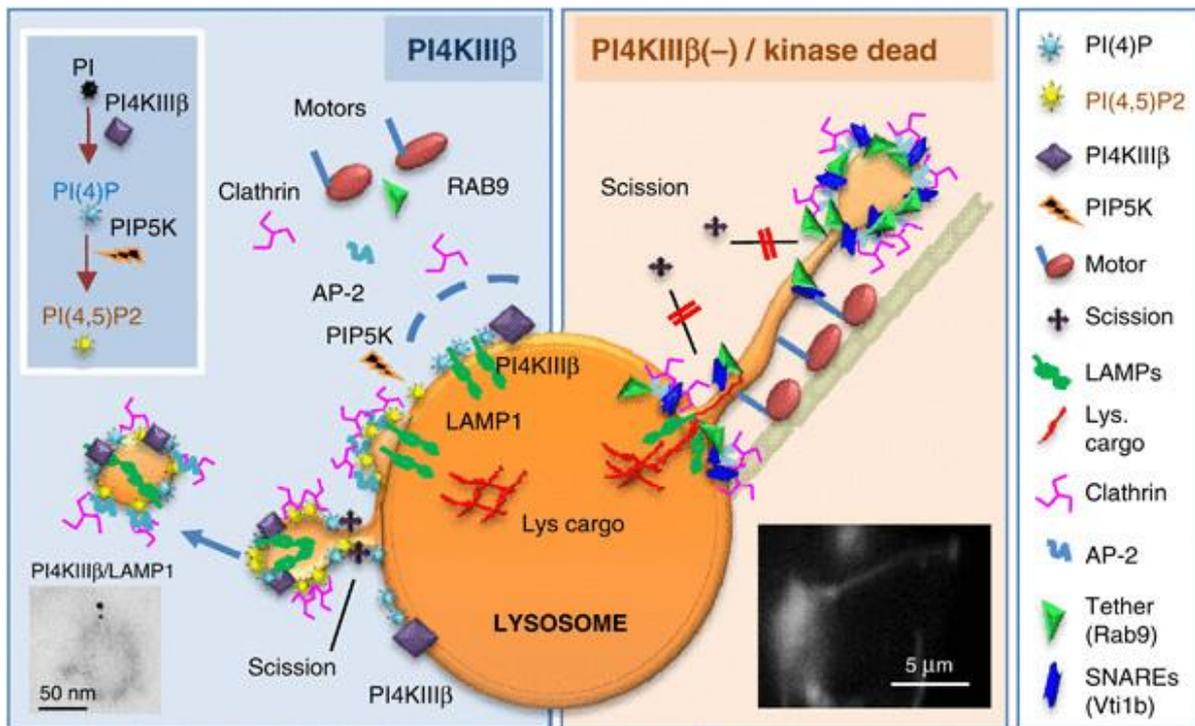


Figure 15 : Modèle hypothétique du rôle de la PI4KIIIβ dans la reformation des lysosomes. (A gauche): La PI4KIIIβ participe au tri des composants de la membrane des lysosomes qui seront recyclés et à la rétention des cargos de la lumière. La protéine régule la formation des vésicules impliquées dans ce processus en régulant la dynamique de l'association entre la clathrine et les protéines adaptatrices au niveau de la vésiculation. Quand un recyclage abondant est à effectuer, en condition de déprivation par exemple, la tubulation est favorisée au détriment de la vésiculation par la conversion du PI(4)P en PI(4,5)P<sub>2</sub>. (A droite): L'absence de PI4KIIIβ provoque une mauvaise formation du manteau protéique de clathrine, la formation anormale d'un tubule qui pourrait résulter d'un échec du recrutement de la machinerie de fission de la vésicule et/ou d'un étirement de la vésicule par des moteurs protéiques et d'un efflux anormal des cargos de la lumière dans le tubule. (Sridhar et al., 2013).

### (b) La reformation des lysosomes : importance pour le système nerveux central:

La tubulation d'autolysosomes n'a jamais été directement observée dans des neurones. Ceci suggère que la reformation des lysosomes dans les neurones pourrait se produire par bourgeonnement de vésicules et non par tubulation. Par ailleurs la reformation des lysosomes semble être altérée dans le cas des maladies de surcharge des lysosomes (Li et al., 2016; Platt et al., 2012). L'importance physiologique de la reformation des lysosomes est soulignée par le fait que de nombreuses protéines participant à l'ALR sont associées à des maladies neurodégénératives.

Ainsi, des mutations dans les gènes codant pour les sous-unités du complexe AP-4 sont impliquées dans des maladies neurodégénératives : les paraplégies spastiques héréditaires (PSH) (Tesson et al., 2015). Un modèle de drosophile mutante pour le gène *spin* codant pour spinster présente un

phénotype neurodégénératif (Nakano et al., 2001). L'enzyme lysosomale glucocerebrosidase 1 (GBA1) est impliquée dans l'ALR et le bon fonctionnement de cette enzyme est nécessaire pour la réactivation de mTOR (Magalhaes et al., 2016). L'ALR est altérée en présence de mutations dans le gène *GBA1*, ce qui pourrait être une conséquence, comme pour le cas de spinster, d'une altération métabolique des lysosomes plus que d'un rôle moléculaire direct dans la reformation des lysosomes. Chez l'Homme, des mutations dans les deux allèles du gène *GBA1* sont responsables de la maladie de Gaucher qui a une composante neurologique (Stirnemann et al., 2017) et des mutations hétérozygotes sont un facteur de risque pour la maladie de Parkinson (Magalhaes et al., 2016). La diminution de l'expression de la spatistine ou de la spatacsine, dont les pertes de fonctions sont responsables respectivement des formes SPG15 et SPG11 de PSH, perturbe l'ALR (Chang et al., 2014). Ces deux protéines pourraient être impliquées dans l'initiation de la tubulation et de la vésiculation, notamment par une interaction avec PI4KIII $\beta$ .

Ces données suggèrent que la reformation des lysosomes est cruciale pour maintenir les fonctions des lysosomes dans le système nerveux central, mais les mécanismes impliqués sont encore relativement méconnus. L'étude de la reformation des lysosomes dans un contexte neurodégénératif est nécessaire pour comprendre l'importance de ce processus pour le SNC.

La spatacsine, dont la perte de fonction est à l'origine de la PSH de type SPG11, semble être impliquée dans l'initiation de la tubulation des autolysosomes dans des modèles non neuronaux (Chang et al., 2014). L'étude d'un modèle murin de la pathologie soutient cette hypothèse : les auteurs ont noté une diminution du nombre de lysosomes fonctionnels dans les cellules du cervelet et du cortex *in vivo* (Varga et al., 2015).

## II) Dysfonctions des lysosomes dans les paraplégies spastiques héréditaires (PSH) :

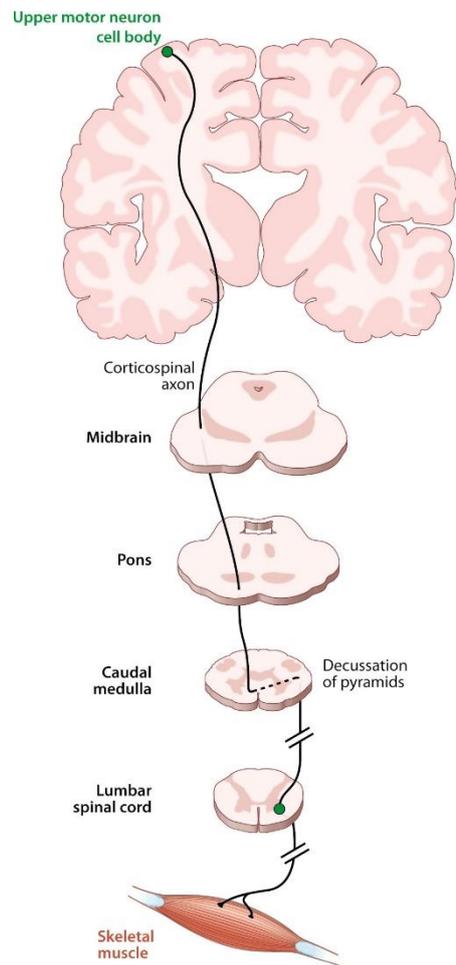
L'étude de la physiopathologie des PSH peut être un moyen de comprendre certains mécanismes qui contribuent à la fonction des lysosomes.

### 1) Les paraplégies spastiques héréditaires :

Les PSH sont un groupe de maladies neurodégénératives rares, très hétérogènes cliniquement et génétiquement, caractérisées par une atteinte de la voie pyramidale (ou faisceau corticospinal) qui contrôle les mouvements volontaires, associée à d'autres atteintes neuropathologiques dans les formes complexes de PSH.

#### (a) Le Faisceau corticospinal :

Le faisceau pyramidal (Figure 16) comprend les axones des neurones moteurs de la couche V du cortex qui transmettent les commandes motrices jusqu'aux interneurons et motoneurons situés dans la moelle épinière (seconds motoneurons ou motoneurons inférieurs). L'une des caractéristiques majeures de ce faisceau est la longueur des axones qui le composent : jusqu'à 1 mètre de long chez l'homme. Les corps cellulaires sont situés dans la couche V du cortex moteur. Les axones traversent le pédoncule cérébral et la protubérance bulbaire. Ceux qui sont destinés à la moelle épinière se regroupent au niveau du bulbe, à l'extrémité duquel la grande majorité (80 à 90%) d'entre eux décussent pour former le faisceau corticospinal latéral. Ces neurones connectent principalement des interneurons dans la corne intérieure de la moelle épinière et contrôlent majoritairement des muscles de l'extrémité des membres. Les axones restant qui ne décussent pas descendent directement dans la moelle épinière et forment le faisceau corticospinal antérieur. Ils contrôlent les muscles de la nuque, du tronc, des épaules et des cuisses.



**Figure 16 : Représentation schématique du faisceau corticospinal (Blackstone, 2012)**

## (b) Symptômes des PSH :

L'atteinte de la voie pyramidale induit l'apparition d'un syndrome pyramidal, signe clinique partagé par toutes les PSH. Ce syndrome se traduit par une spasticité au niveau des membres inférieurs qui produit des troubles de la marche, on parle de démarche spastique (Figure 17 A). Ces troubles sont progressifs et s'aggravent avec le temps. Les patients ont une faiblesse motrice invalidante qui peut aller jusqu'à la paralysie. La spasticité correspond à une raideur musculaire provoquée par une hypercontractibilité des muscles. Elle est liée à des activités motrices réflexes normalement inhibées par la voie corticospinale. On observe aussi une augmentation du réflexe ostéo-tendineux ainsi que la présence du signe de Babinski (réponse en extension du gros orteil lors de la recherche du réflexe cutané plantaire, Figure 17B-D). Dans les PSH, la dégénérescence du faisceau corticospinal est dite rétrograde : on parle de « dying-back ». L'étude neuropathologique réalisée chez des cas post-mortem de patients affectés par des PSH a montré que la perte de fibres de neurones est plus importante dans la moelle lombaire que dans la moelle cervicale (Deluca et al., 2004). Les axones dysfonctionnent et dégèrent depuis la synapse vers le corps cellulaire qui survit dans certains cas, comme cela a été observé par exemple dans un modèle de souris mutée dans le gène *REEP1* qui mime la PSH de type SPG31 (Betz et al., 2013). En accord avec ces observations, les muscles des membres inférieurs sont les premiers affectés dans les PSH ce qui suggère que les axones les plus longs sont les premiers à dégénérer. On parle souvent d'axonopathie dans le cas des PSH.

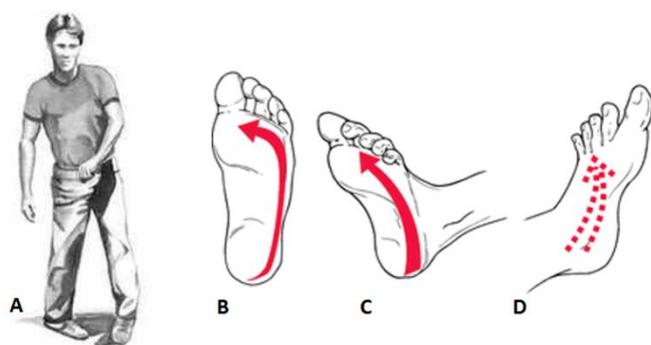


Figure 17 : (A) Représentation d'une marche spastique ([www.medfriendly.com](http://www.medfriendly.com)) (B-D) La stimulation de la plante du pied avec une pointe (B) permet de tester l'absence (C) ou la présence (D) du signe de Babinski. (<http://medical-dictionary.thefreedictionary.com>).

Toutefois, les PSH sont extrêmement hétérogènes sur le plan clinique. Si le seul symptôme présent est le syndrome pyramidal on parle de PSH pures. Si d'autres signes cliniques neurologiques ou extra neurologiques sont observés, on parle de formes complexes (ou compliquées) selon la classification proposée par Harding (Harding, 1983). La classification des PSH fait encore débat aujourd'hui et plusieurs auteurs suggèrent d'autres critères de classification (Synofzik and Schüle, 2017; Vallat et al., 2016). Parmi les signes cliniques retrouvés dans les PSH complexes, on retrouve (de manière non exhaustive) : ataxie, démence, retard mental, déficit cognitif, épilepsie, anomalie du squelette, amyotrophie, atrophie du nerf optique etc. (Lo Giudice et al., 2014). A ce jour, les

seuls traitements proposés aux patients ont pour but d'atténuer les symptômes. La spasticité peut être limitée par la prise de médicaments myorelaxants comme le baclofène. Des injections de toxine botulique peuvent aussi être indiquées dans le même but (Synofzik and Schüle, 2017). Ces traitements sont toutefois insuffisants et la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques est nécessaire pour améliorer les solutions proposées aux patients.

### **(c) Diagnostic des PSH :**

Lors du diagnostic, la paraplégie spastique héréditaire est suspectée dès lors que les autres causes acquises ou innées qui peuvent induire un syndrome pyramidal ont été écartées à l'aide de l'imagerie cérébrale et de test biochimiques notamment. Parmi ces autres causes possibles on peut citer : la leucodystrophie, un déficit en vitamine B12, la sclérose en plaque, une sclérose latérale amyotrophique, une ataxie de Friedreich ou encore des altérations structurelles du cerveau ou de la moelle épinière (Lo Giudice et al., 2014). La présence de signes cliniques associés peut rendre le diagnostic difficile à cause de chevauchements avec des symptômes d'autres pathologies, surtout dans certaines formes de PSH ou la paraplégie spastique n'est pas le signe prédominant (de Souza et al., 2017). Les PSH étant des pathologies héréditaires, l'analyse de l'historique clinique de la famille est très importante.

### **(d) Causes génétiques et modes de transmission des PSH :**

A ce jour 76 loci et 58 gènes ont été identifiés comme étant responsables de PSH traduisant une grande hétérogénéité génétique (Parodi et al., 2017) qui à elle seule explique en partie l'hétérogénéité clinique. Les gènes (et loci) identifiés sont nommés SPG (SPastic parapleGia, loci). Le mode de transmission peut être autosomique dominant, récessif, transmis par l'X ou même via l'ADN mitochondrial (Parodi et al., 2017). On compte à ce jour 19 gènes identifiés pour un mode de transmission dominant. Les mutations de ces gènes sont responsables, le plus souvent, de formes pures de la pathologie. 57 loci et 52 gènes sont connus pour causer des formes autosomiques récessives, qui le plus souvent sont complexes cliniquement. 5 formes de PSH ont une transmission liée à l'X ou par ADN mitochondrial (Parodi et al., 2017). Malgré la découverte de nombreux gènes, le gène en cause est encore inconnu dans plus de la moitié des cas (Tesson et al., 2015). Des modes de transmissions multiples sont possibles, c'est par exemple le cas des PSH de type 72 (*SPG72/REEP2*) et 9 (*SPG9/ALDH18A1*) pour lesquelles des modes de transmission récessif et dominant ont été observés (Coutelier et al., 2015; Esteves et al., 2014). Il faut également noter que certains gènes sont aussi impliqués dans d'autres pathologies, c'est notamment le cas du gène *SPG11* muté dans des formes rares de sclérose latérale amyotrophique (forme ALS-5) et de la maladie de Charcot-Marie-Tooth (Daoud et al., 2012; Montecchiani et al., 2016; Orlacchio et al.,

2010). Cet exemple montre les chevauchements des symptômes entre différentes maladies neurodégénératives et illustre la difficulté de diagnostic des PSH.

Malgré un grand nombre de gènes impliqués dans les PSH l'étude des produits de ces gènes a permis de les regrouper dans un nombre relativement restreint de voies cellulaires. Les PSH représentent alors un moyen de comprendre quelles dysfonctions cellulaires sont délétères pour les longs axones du faisceau corticospinal (Blackstone, 2012).

## 2) Les voies cellulaires impliquées dans les PSH :

Plusieurs fonctions cellulaires ont été mises en évidence comme étant altérées dans les PSH (Figure 18). On peut citer : le trafic vésiculaire et membranaire, la mise en place et le maintien de la morphologie du réticulum endoplasmique, les voies endolysosomales, le métabolisme des lipides ou encore les fonctions mitochondriales (Klebe et al., 2015). Toutefois plusieurs protéines impliquées dans les PSH ont un rôle dans différentes voies ce qui suggère que ces voies cellulaires pourraient être interconnectées. Il est difficile de savoir quelle fonction est la plus importante ou celle unifiant les autres voies en aval dans la mise en place et l'évolution de la pathologie.

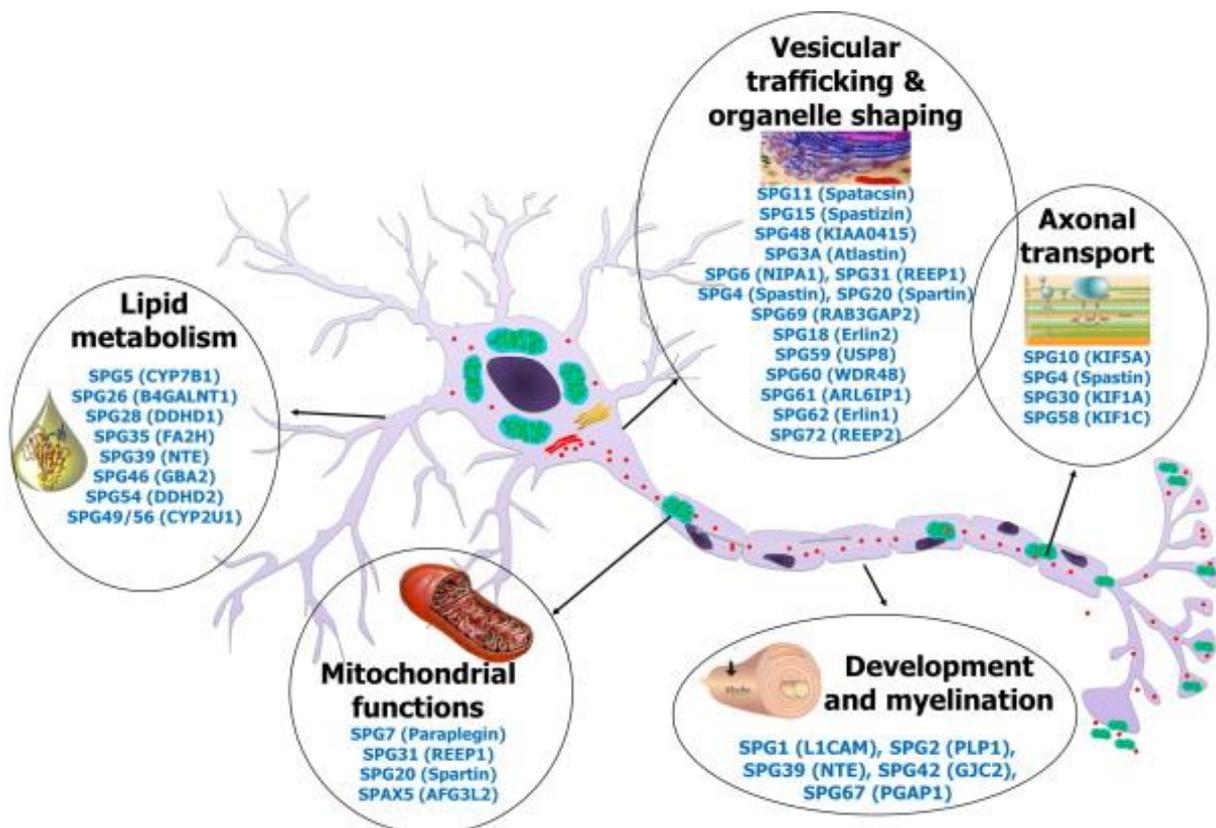
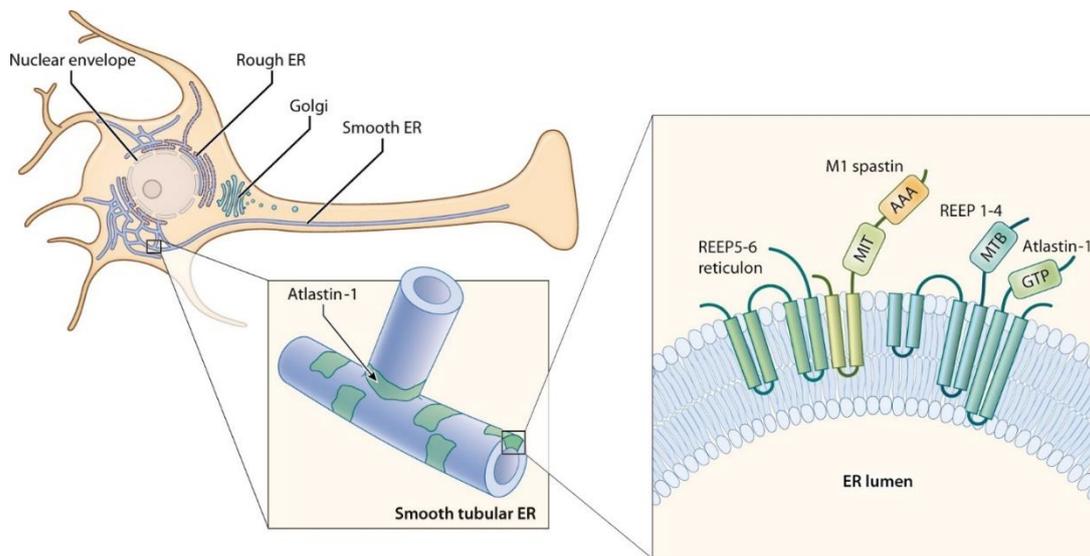


Figure 18 : Principales fonctions cellulaires affectées dans les PSH. Le trafic vésiculaire fait référence notamment aux fonctions dans les voies endolysosomales. Il est important de noter que certaines protéines sont impliquées dans plusieurs fonctions. (Klebe et al., 2015).

### (a) La mise en place et le maintien de la morphologie du réticulum endoplasmique (RE) :

L'organisation du RE semble être cruciale pour la survie des axones de la voie pyramidale. Cet organe qui participe à la synthèse et la maturation de protéines, de lipides, au stockage de calcium ainsi qu'aux échanges de protéines, lipides, sucres et ions avec tous les autres organites cellulaires est composé de 3 parties morphologiquement distinctes : l'enveloppe nucléaire, le RE rugueux qui tire son nom des ribosomes qui lui sont associés et d'un réseau de tubules qui parcourent la totalité de la cellule et contactent les autres organites pour des échanges (Phillips and Voeltz, 2016). Plusieurs morphogènes du RE sont mutés dans des formes de PSH (Blackstone, 2012) (Figure 19).



 Blackstone C. 2012.  
Annu. Rev. Neurosci. 35:25–47

**Figure 19 : Plusieurs protéines codées par des gènes mutés dans des formes de PSH jouent un rôle dans la mise en place et le maintien de la morphologie du RE. MIT : Microtubule Interacting and Trafficking molecule domain ; AAA : ATPases Associated with diverse cellular Activities; MTB: Microtubule Binding Domain. (Blackstone, 2012).**

Ainsi, les 3 formes de PSH autosomiques dominantes les plus fréquentes sont causées par des mutations de morphogènes du RE : *SPG3A*, *SPG4* et *SPG31* qui codent respectivement pour l'atlastine 1, la spastine et REEP1 (Blackstone, 2012). Ces protéines ont pour point commun de posséder des domaines en épingle à cheveux qui permettent l'insertion de ces protéines dans la membrane et qui contribuent à sa courbure en occupant une place plus importante dans le feuillet externe de la membrane que dans le feuillet interne (Figure 19) (Blackstone, 2012). L'atlastine 1 est une protéine à activité GTPase de la superfamille des dynamines et qui est impliquée dans la formation des jonctions triples entre les tubules du RE (Figure 19); la spastine participe au maintien de la structure des tubules, interagit avec l'atlastine 1 et REEP1 et possède une activité de clivage

des microtubules ; REEP1 interagit avec les microtubules et permet la mise en place et le maintien des tubules (Blackstone, 2012). Certaines autres protéines impliquées dans des PSH jouent aussi un rôle dans la morphologie du RE (*SPG12*/Reticulon 1 ; *SPG72*/REEP2 notamment). La bonne morphologie des tubules du RE apparait donc très importante pour le bon fonctionnement des longs axones. Les tubules présents dans ces axones sont eux aussi très longs (Figure 19). Toutefois, les fonctions précises du RE, impactées par l'altération de la morphologie et qui sont les plus pertinentes pour la physiopathologie des PSH sont encore floues. Par exemple le rôle du RE dans le maintien de l'homéostasie calcique pourrait être affecté par des altérations de sa morphologie. Les tubules participent aux échanges de calcium avec les autres organites et à l'import de calcium extracellulaire par le SOCE. Ce mécanisme, introduit plus en amont dans l'introduction (Figure 9) permet à la cellule de remplir ses stocks de calcium intracellulaire. Cela a par exemple été démontré dans des modèles cellulaires : la diminution de l'expression ou la surexpression de atlastine 1, 2 ou 3 (ces 3 protéines ont des rôles similaires) a un impact sur la morphologie du RE et induit une diminution de l'import de calcium par le SOCE (Figure 20) (Li et al., 2017a).

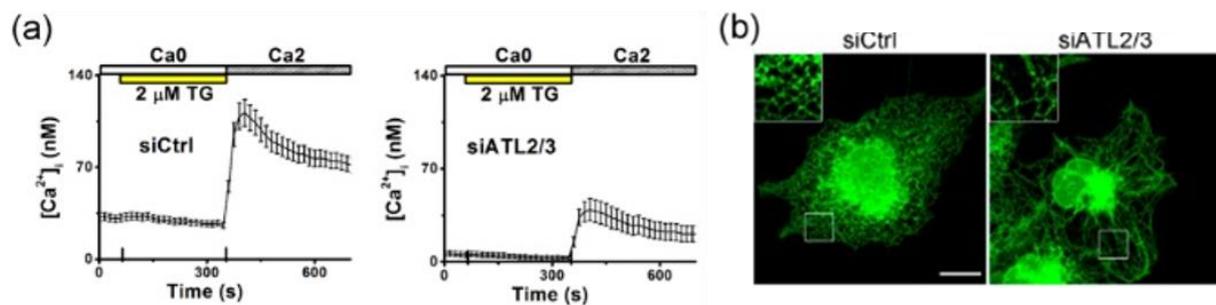


Figure 20 : Altération du SOCE quand l'expression des atlastines 2 et 3 est diminuée par ARN interférent dans des cellules COS-7. (A) Mesure en nM des concentrations de calcium intracellulaire. Le SOCE est déclenché par la déplétion des stocks de calcium du RE induite par la thapsigargine (TG) et l'ajout de calcium en extracellulaire permet d'évaluer l'import de calcium par le SOCE. Cet import est réduit quand l'expression des atlastines 2 et 3 est diminuée. (B) La morphologie du RE est observée par immunomarquage de la calréticuline. Les encarts montrent des agrandissements de zones où le réseau de tubules du RE est normal (Gauche : cellules traitées par un ARN interférent contrôle) ou anormal et constitué de longs tubules mal reliés entre eux (Droite : cellules traitées par un ARN interférent ciblant l'expression des atlastines 2 et 3). Adapté de (Li et al., 2017a).

De plus, d'autres gènes affectés dans les PSH codent pour des protéines jouant des fonctions au niveau du RE mais sans que la morphologie du RE soit affectée. Des mutations pertes de fonctions dans les gènes *SPG62* et *SPG18* codant respectivement pour les protéines Erlin-1 et Erlin-2 qui jouent un rôle dans la dégradation des récepteurs à l'IP3 par la voie ERAD (Endoplasmic Reticulum Associated Degradation) sont responsables de PSH complexes très sévères sur le plan clinique (Alazami et al., 2011; Novarino et al., 2014). Des mutations dans ces gènes affectent

l'homéostasie calcique du RE. Le complexe Erlin, dont font partie Erlin-1 et Erlin-2, participe aussi à la dégradation, via la voie ERAD, de l'HMG-coA réductase, enzyme clef de la synthèse de cholestérol (Jo and DeBose-Boyd, 2010). Ceci suggère que le rôle d'Erlin-1 et 2 dans le métabolisme des lipides pourrait aussi contribuer à la physiopathologie des PSH. Le métabolisme des lipides est par ailleurs dérégulé dans plusieurs formes de PSH.

### **(b) Métabolisme des lipides :**

Plusieurs formes de PSH sont causées par des mutations dans des gènes codant pour des protéines impliquées dans le métabolisme de certains lipides. La forme SPG5 est causée par des mutations dans le gène qui produit la protéine CYP7B1 impliquée dans le métabolisme du cholestérol. Les taux de substrats oxystérols sont augmentés dans le liquide céphalorachidien et le sang des patients (Schüle et al., 2010). Des mutations dans le gène *B4GLNT1* sont responsables de la forme SPG26. Ce gène participe à la synthèse du ganglioside GM2 et sa perte de fonction induit l'augmentation de GM3 (précurseur de GM2) et la disparition de GM2 (Harlalka et al., 2013). Ceci suggère que des perturbations du métabolisme des gangliosides peuvent être à l'origine de PSH comme c'est le cas pour d'autres maladies neurodégénératives : les maladies de surcharges des lysosomes notamment. Toutefois dans les MSL, c'est la fonction de catabolisme (ou d'efflux) qui semble principalement en cause et non des problèmes de biosynthèse. D'autres protéines liées aux PSH jouent un rôle direct dans le métabolisme des lipides, on peut citer notamment : DDHD2 (SPG54) qui est une triglycéride-lipase (Inloes et al., 2014) ou encore CYP2U1 (SPG56) qui participe à l'hydroxylation des acides gras (Tesson et al., 2012).

De plus, plusieurs protéines semblent être impliquées dans la régulation des gouttelettes lipidiques. La spastine est localisée au niveau des gouttelettes lipidiques et la diminution de son expression ou l'expression d'une forme dominante négative cause la diminution du nombre de gouttelettes dans un modèle de drosophile (Papadopoulos et al., 2015). Les gouttelettes s'accumulent aussi dans le cerveau d'un modèle de dont le gène *DDHD2* a été invalidé (Inloes et al., 2014). L'absence de la protéine spartine, causant le syndrome de Troyer (SPG20) induit l'augmentation du nombre de gouttelettes dans le tissu adipeux des femelles souris (Renvoisé et al., 2012). Il faut noter que la formation des gouttelettes lipidiques a lieu au niveau du RE et que des défauts de sa morphologie pourraient affecter leur formation. En effet, des altérations du nombre et de la taille des gouttelettes lipidiques sont observées dans des cellules où les morphogènes du RE (altlastine, spastine, REEP1) sont modulés (Falk et al., 2014; Klemm et al., 2013; Papadopoulos et al., 2015). Ces différentes études soulignent l'importance de la bonne régulation du métabolisme des lipides pour les axones du faisceau corticospinal.

### (c) Voies endolysosomales :

De nombreux gènes mutés dans les PSH participent aux fonctions de la voie endolysosomale, des fonctions cellulaires par ailleurs très importantes pour la régulation du métabolisme des lipides comme nous l'avons vu dans le cas des MSL.

Une étude très récente propose qu'un défaut de fission des endosomes, résultant d'une altération des contacts entre ER et endosomes, perturbe le trafic des enzymes lysosomales provoquant des dysfonctions de ces organites dans plusieurs formes de PSH (Figure 21) (Allison et al., 2017). Ces altérations pourraient notamment résulter des défauts de la morphologie du RE évoqués plus en amont dans cette introduction.

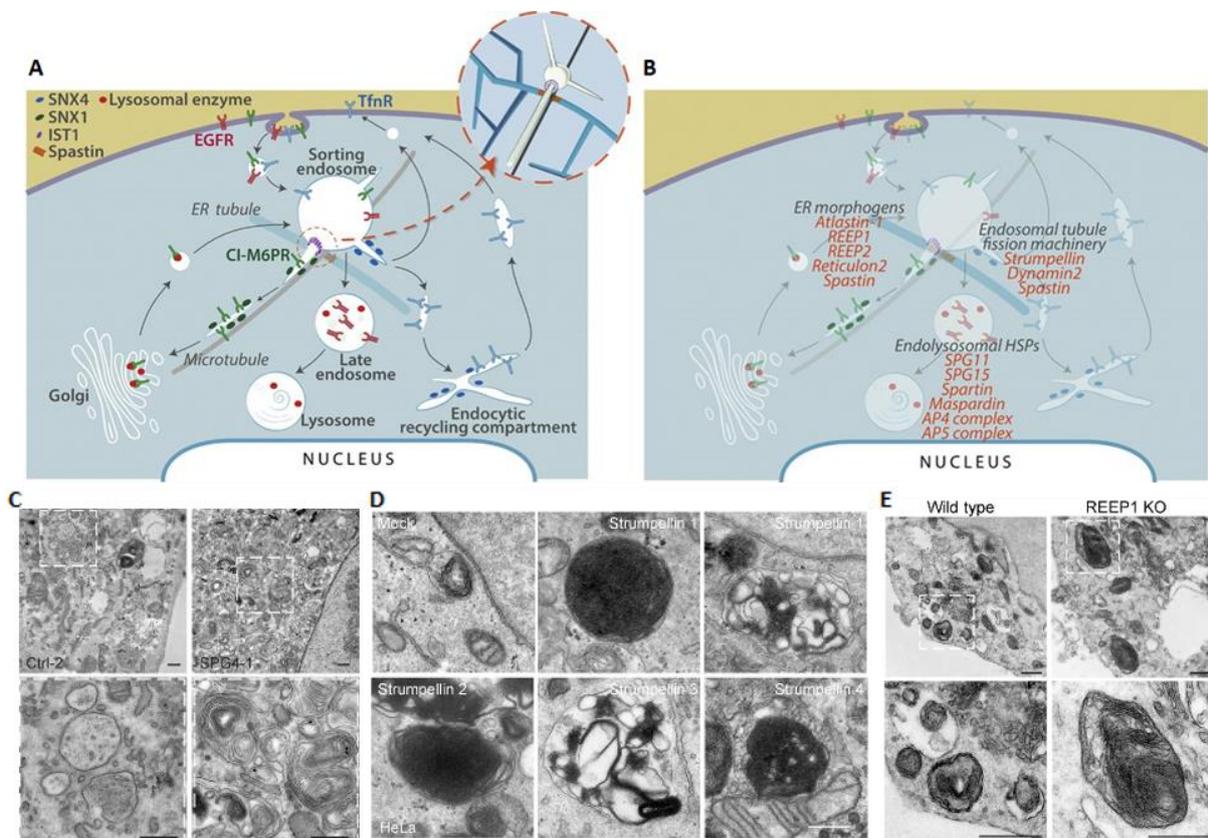


Figure 21 : (A) Schéma d'un modèle proposé pour les interactions entre les tubules de RE et les endosomes. Ces contacts, dans lesquels sont impliqués la spastine par exemple, participent à la formation de tubulation des endosomes et au bon trafic de différentes enzymes. (B) Site d'action proposé pour différentes protéines des PSH qui sont impliquées dans le trafic membranaire. (C-E) Altérations du système endolysosomal retrouvé dans (C) des fibroblastes de peau de patients SPG4, (D) de cellules HeLa dans lesquelles l'expression de la strumpelline (*SPG8*) est diminuée et (E) des neurones de cortex d'un modèle de souris muté pour le gène *Reep1*. Barre d'échelles = 500nm. Adapté de (Allison et al., 2017).

Ainsi, la spastine joue un rôle dans la fission des endosomes et son absence est responsable d'altérations morphologiques des lysosomes. Des défauts similaires sont observés dans des modèles

cellulaires des formes SPG8 (Strumpellin) et SPG31 (REEP1). Les dysfonctions lysosomales et leur impact sur les fonctions de dégradation, notamment dans les voies autophagiques pourraient être responsables de l'axonopathie des PSH (Allison et al., 2017). Les auteurs proposent que les altérations de la fonction des lysosomes, induites par des problèmes de fission des endosomes, soient semblables à celles observées dans d'autres formes de PSH : les formes SPG11, SPG15 et SPG48. Des études de microscopies électronique et photonique sur des fibroblastes de patients SPG48, pathologie causée par des mutations dans le gène codant la sous-unités zêta du complexe AP-5 (AP5Z1), ont permis de mettre en évidence des altérations du système endolysosomal. Les structures observées sont en forme multilamellaire ou « d'empreinte digitale » (Figure 22A et B). Ces stigmates sont réminiscent des maladies de surcharge des lysosomes (Hirst et al., 2015). La caractérisation d'un modèle murin de la forme SPG15, dont le produit du gène interagit avec AP5Z1 a montré des défauts similaires (Figure 22C-H). Les souris mutantes développent une paraplégie spastique qui apparaît tardivement et la mort neuronale est précédée par l'accumulation de dépôts à l'intérieur des cellules, entourés par des membranes qui sont positifs pour le marqueur, d'endosomes tardifs et de lysosomes, Lamp1 (Khundadze et al., 2013).

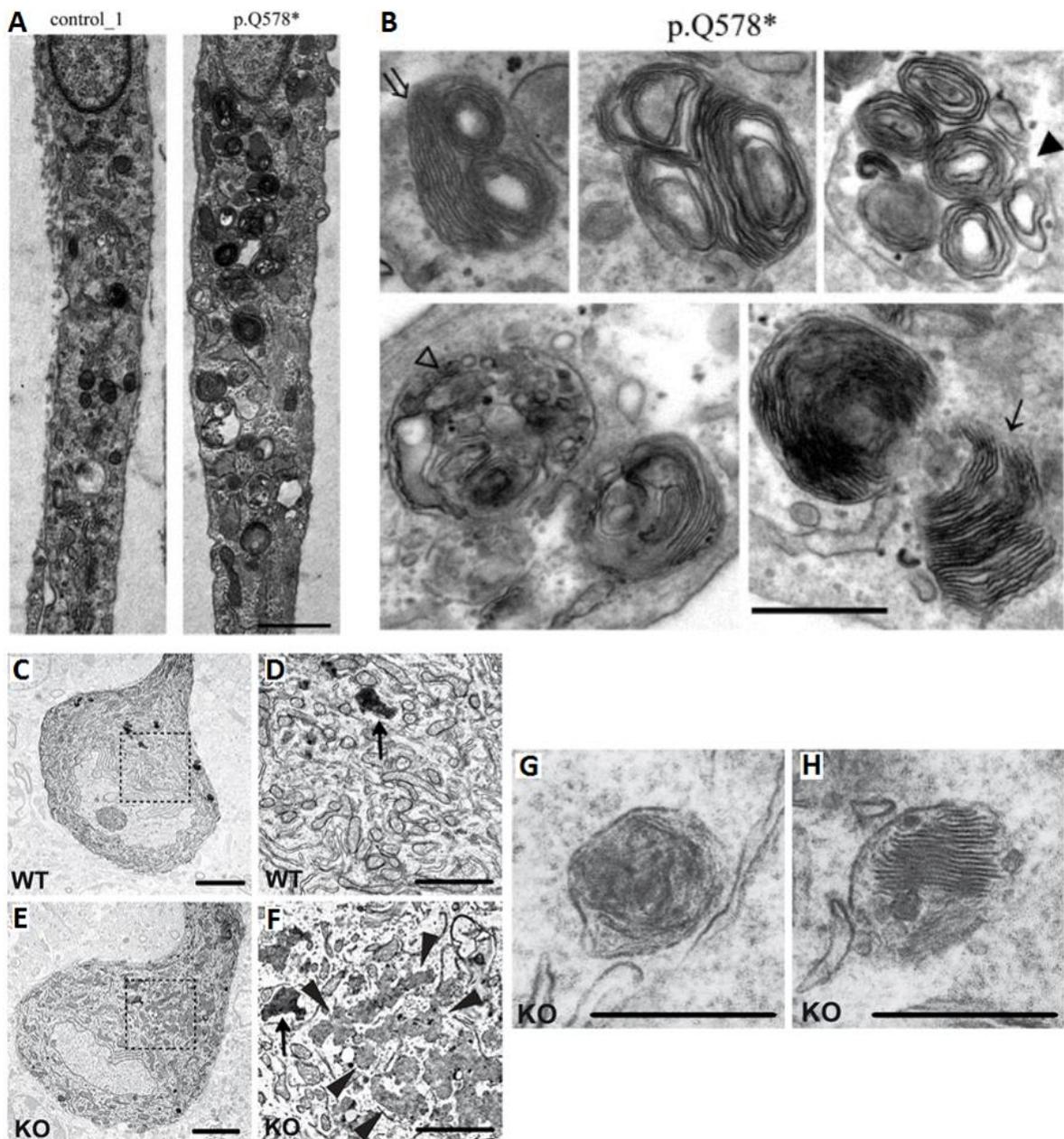


Figure 22 : Altérations morphologiques du système endolysosomal dans les PSH de type SP48 et SPG15. (A et B) Images de microscopie électronique réalisées sur les fibroblastes d'un sujet sain (control\_1) et d'un patient atteint par la PSH de type SPG48 (P.Q578\*). On peut noter l'accumulation de différents matériels dans les structures endolysosomales. Barres d'échelles = (A) 1 $\mu$ m, (B) 500nm. (C-H) Images de microscopie électronique réalisées sur des cellules de Purkinje dans le modèle murin SPG15 (KO). Des particules de type lipofuscine sont retrouvées chez les cellules WT et KO (flèches) mais ces dernières contiennent des accumulations anormales (têtes de flèches) et présentent certains endolysosomes anormaux (H). Une structure normale est montrée en (G). Barre d'échelle =(C et E) 5 $\mu$ m, (D et F) 2 $\mu$ m, (G et H) 500nm. Adapté de (Hirst et al., 2015; Khundadze et al., 2013).

Une autre forme de PSH caractérisée par des problèmes des voies endolysosomales est la forme SPG11. Cette PSH est causée par des mutations dans le gène *SPG11* qui code pour la spatacsine (Stevanin et al., 2007). Cette protéine interagit avec les produits des gènes mutés dans les formes SPG15 et SPG48, suggérant des fonctions communes et des mécanismes physiopathologiques partagés. Au cours de ma thèse, j'ai étudié des modèles cellulaires murins de la PSH de type SPG11.

### 3) La PSH de type SPG11 :

#### (a) Description clinique :

La PSH de type SPG11 est la forme la plus fréquente de PSH à transmission autosomique récessive (Tesson et al., 2015). Le gène responsable de cette forme complexe de la pathologie a été identifié en 2007 (Stevanin et al., 2007). La PSH de type SPG11 débute souvent lors de la première décennie de la vie et la progression de la pathologie est fatale. Les patients décèdent habituellement 30 à 40 ans après le début de la maladie (de Bot et al., 2013) et à ce jour aucun traitement autre que symptomatique n'est proposé aux patients. En plus du syndrome pyramidal les patients peuvent souffrir de symptômes neurologiques ou extra-neurologiques tel qu'une ataxie cérébelleuse, un retard mental, un syndrome Parkinsonien, une neuropathie, un déficit cognitif, une dysphagie et des altérations visuelles (de Souza et al., 2017). Une atrophie du corps calleux est fréquemment retrouvée à l'IRM (Figure 23) (Boukhris et al., 2008). D'un point de vue clinique la forme SPG11 est indissociable de la forme SPG15 (Hancin et al., 2008; Pensato et al., 2014).

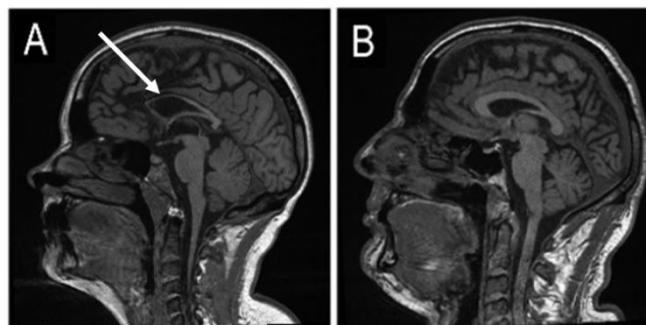


Figure 23 : Amincissement du corps calleux dans la PSH de type SPG11. (A) Image IRM (T1) d'une femme âgée de 39 ans qui a développé la maladie à 16 ans. L'image montre un amincissement du corps calleux marqué par une flèche blanche. (B) Image IRM (T1) d'un homme de 52 ans atteint d'une PSH de type SPG4 depuis l'âge de 29 ans. Ce sujet présente un corps calleux normal à l'IRM. Adapté depuis (Boukhris et al., 2008).

## (b) Génétique et chevauchement avec d'autres pathologies :

Le gène *SPG11* a aussi été associé à des formes rares et juvéniles à progression lente de sclérose latérale amyotrophique (ALS-5) et à des formes rares de maladie de Charcot-Marie-Tooth (Daoud et al., 2012; Montecchiani et al., 2016; Orlacchio et al., 2010). De manière cohérente, une récente analyse neuropathologique du cerveau de deux patients a montré des lésions qui rappellent celles observées dans des cas de sclérose latérale amyotrophique. En effet, des agrégats composés d'ubiquitine et de p62 ont été observés (Denora et al., 2016). La majorité des mutations retrouvées chez les patients sont des mutations aboutissant à l'apparition d'un codon stop prématuré dans les ARN messagers, ce qui suggère un mécanisme de perte de fonction (Figure 24). La protéine encodée par le gène *SPG11/KIAA1840* est la spatacsine (pour **SPA**sticity with **TH**in or **AT**rophied **C**orpus callosum **SYN**drome ; (Stevanin et al., 2007)).

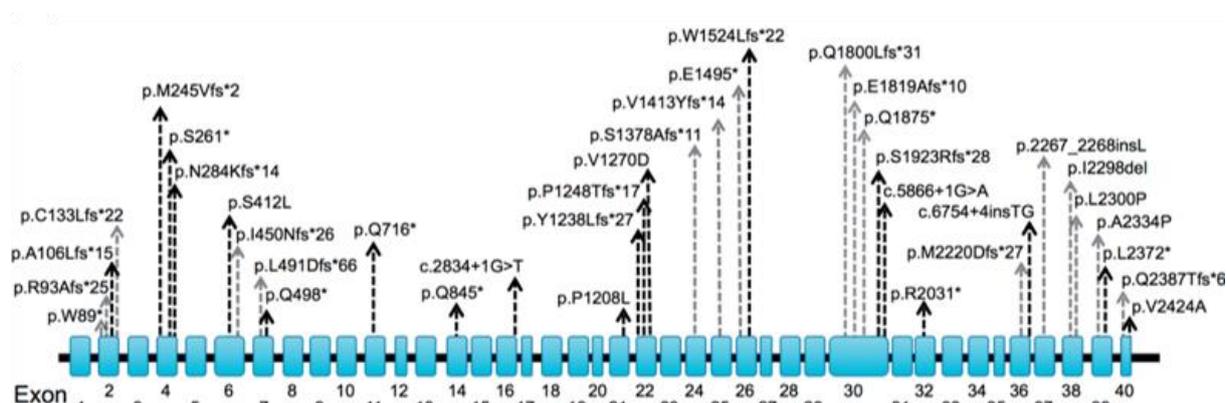


Figure 24 : Sélection de mutations du gène *SPG11* retrouvées dans une cohorte de patient à Londres. Les mutations déjà connues sont indiquées par des flèches noires, les nouvelles par des flèches grises. Il faut noter que les mutations (plus de 120 à ce jour) sont retrouvées sur l'ensemble du gène. (Kara et al., 2016).

## (c) La spatacsine :

C'est une protéine de 2443 acides aminés dont la partie C-terminale est très conservée au cours de l'évolution (pfam 14649), le domaine C-terminal s'aligne avec le domaine C-terminal de la protéine orthologue d'*Arabidopsis thaliana*. Elle est exprimée ubiquitairement (The Human Protein Atlas : <http://www.proteinatlas.org/ENSG00000104133-SPG11/tissue>). Des alignements de séquence de la protéine n'ont pas permis de mettre en évidence la présence d'un domaine fonctionnel connu. La protéine ne s'aligne d'ailleurs avec aucune autre protéine du génome humain. La structure tridimensionnelle de la protéine est à ce jour inconnue. La spatacsine pourrait contenir quatre domaines transmembranaires (Stevanin et al., 2007) mais aucune donnée fonctionnelle n'a prouvé leur existence. Des études bio-informatiques suggèrent que la spatacsine pourrait contenir des domaines  $\alpha$ -solénoïdes analogues à ceux des chaînes lourdes de clathrine ou aux protéines COPI, ce qui pourrait suggérer un rôle de manteau protéique (Hirst et al., 2013).

(i) Localisation :

La localisation subcellulaire de la spatacsine n'est pas clairement identifiée et différentes études proposent des localisations très variées. Ainsi, la spatacsine a été localisée dans différents compartiments cellulaires tels que le cytoplasme, le réticulum endoplasmique, le cytosquelette, ou encore les lysosomes (Figure 25) (Chang et al., 2014; Hirst et al., 2013; Murmu et al., 2011). Dans des neurones dérivés d'iPS (induced Pluripotent Stem cells) et des neurones de cortex de souris, la spatacsine a été observée dans les axones et les dendrites. Elle co-localise avec des marqueurs du cytosquelette et de vésicules synaptiques (Mishra et al., 2016). Il faut noter que les co-localisations avec les différents organites sont toujours partielles et que la spatacsine a une localisation cytoplasmique diffuse et parfois « granuleuse » (Figure 25).

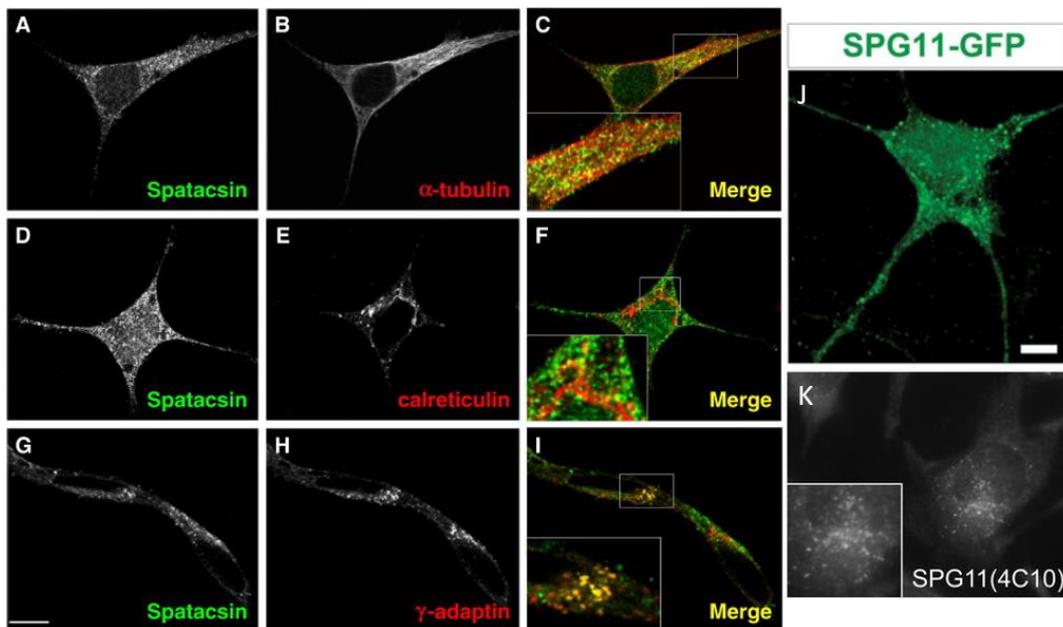


Figure 25 : Localisation subcellulaire de la spatacsine endogène ou surexprimée dans différents types cellulaires. (A-I) Localisation de la spatacsine endogène dans des cellules SH-SY5Y. La protéine colocalise partiellement avec des marqueurs du cytosquelette ( $\alpha$ -tubulin), le RE (calreticulin) et des vésicules de trafic ( $\gamma$ -adaptin). (J) Localisation de la spatacsine couplée à la GFP dans des neurones HUES-6d. (K) Localisation de la spatacsine endogène dans des cellules HeLa. Barres d'échelles = 20 $\mu$ m. Adapté depuis (Hirst et al., 2013; Murmu et al., 2011; Pérez-Brangulí et al., 2014).

(ii) Fonctions :

Tout comme la localisation précise de la protéine n'est pas connue, les fonctions moléculaires de la spatacsine sont encore à découvrir. Toutefois, plusieurs études ont permis d'observer les dysfonctions cellulaires induites par la perte de fonction de la spatacsine. La présence de lysosomes anormalement agrandis dans des fibroblastes de patients suggère que la protéine est essentielle à la bonne homéostasie des lysosomes (Figure 26) (Renvoisé et al., 2014). Un crible génétique réalisé

par l'utilisation d'une bibliothèque de petits ARN interférents a identifié le gène *SPG11* comme étant impliqué dans le trafic du cholestérol des lysosomes vers la membrane plasmique (Chu et al., 2015). Ces données suggèrent un rôle de la spatacsine dans les fonctions des lysosomes et dans le métabolisme des lipides.

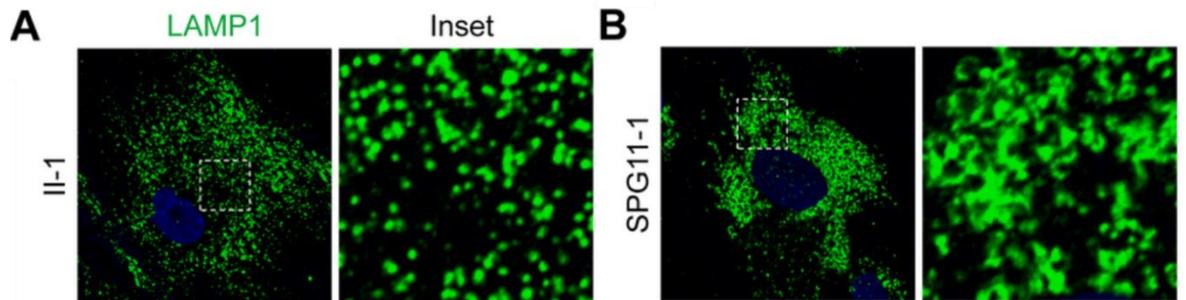


Figure 26 : Les lysosomes des fibroblastes de patients SPG11 (B) présentent des lysosomes (LAMP1) anormalement agrandis par rapport à ceux de sujets saints (A). Adapté depuis (Renvoisé et al., 2014).

### (iii) Les interacteurs de la spatacsine et altérations des voies endolysosomales :

La similarité clinique de la PSH de type SPG11 avec la forme SPG15 a mené à la suspicion de mécanismes physiopathologiques communs dans ces pathologies. Les protéines associées à ces formes de PSH, la spatacsine et la spatizine (respectivement codées par les gènes *SPG11* et *SPG15*) forment un complexe avec le produit du gène *SPG48* (Hirst et al., 2013; Slabicki et al., 2010). La protéine produite par le gène *SPG48* est la sous-unité Zêta (AP5 $\zeta$ 1) du complexe « adaptor protein » AP-5 (Hirst et al., 2013). Le complexe AP-5 aurait un rôle dans le transport vésiculaire de molécules à partir des endosomes tardifs ou lysosomes (Hirst et al., 2011). Le complexe AP-5 est un hétéro-tétramère et la perte d'une des 4 sous-unités entraîne une instabilité des autres sous-unités et la perte de fonction du complexe entier. La perte de fonction du complexe AP-5 aboutit à l'apparition d'altérations dans les voies endolysosomales (Hirst et al., 2013, 2015). L'analyse par microscopie électronique de fibroblastes de peau prélevés sur des patients SPG48 montre des anomalies morphologiques du compartiment endolysosomal : des accumulations multilamellaires de membranes sont observées (Figure 23 A et B) (Hirst et al., 2015). Ces données suggèrent que des matériaux mal digérés s'accumulent dans ces organites, rappelant les phénotypes des maladies de surcharge des lysosomes. Des observations similaires ont été rapportées dans une étude effectuée sur des fibroblastes de peau de patients SPG15 (Renvoisé et al., 2014). Il faut noter que ce genre d'accumulations n'a pas été observé dans des fibroblastes de patients SPG11 (Renvoisé et al., 2014). L'étude d'un modèle murin invalidé pour le gène *SPG15* a lui aussi mis en évidence des accumulations semblables dans les lysosomes des cellules de Purkinje des souris mutantes (Figure 23C-H). Des larges accumulations autofluorescentes sont aussi observées dans ces cellules et

colocalisent avec des marqueurs de lysosomes. Ces altérations apparaissent avant la mort neuronale, suggérant un rôle de ces accumulations dans la physiopathologie (Khundadze et al., 2013).

#### (iv) La spatacsine et la reformation des lysosomes :

La diminution de l'expression de la spatacsine ou de la spastizine par ARN interférent dans des cellules HeLa induit la perturbation du recyclage des lysosomes à partir des autolysosomes. Le nombre de tubules qui émanent des autolysosomes après une déprivation en acides aminés est fortement diminué. Il en résulte une déplétion de lysosomes libres et une augmentation du nombre d'autolysosomes (Figure 27) (Chang et al., 2014). La spatacsine et la spastizine sont donc requises pour l'initiation de la tubulation des autolysosomes lors du processus de reformation des lysosomes après autophagie. La spatacsine agirait au niveau des lysosomes via son interaction avec la spastizine qui lie le PI(3)P par son domaine FYVE. La spastizine et la spatacsine interagissent avec la PI4KIII $\beta$ , qui maintient les niveaux de PI(4)P dans les lysosomes ce qui favoriserait la reformation des lysosomes par vesiculation et empêcherait la tubulation en condition basale (Figure 15) (Sridhar et al., 2013). La conversion du PI(4)P en PI(4,5)P<sub>2</sub>, par la PIP5K1B, qui est requise pour la tubulation ne semble pas altérée ce qui suggère que la spatacsine et la spastizine agissent en aval de cette enzyme ou indépendamment. La diminution du nombre de lysosomes induirait l'accumulation de matériels autophagiques dans les neurones et pourrait conduire à leur mort par déclenchement de l'apoptose. La caractérisation d'un modèle murin invalidé pour le gène *SPG11* supporte ces résultats. En effet, les souris, en absence de spatacsine, développent des phénotypes semblables à la pathologie humaine et les neurones en dégénérescence accumulent des substrats dans les autolysosomes. Le nombre de lysosomes, marqués par Lamp1 mais pas par p62, dans les cellules est diminué et la reformation des lysosomes au cours d'une déprivation semble être altérée (Varga et al., 2015).

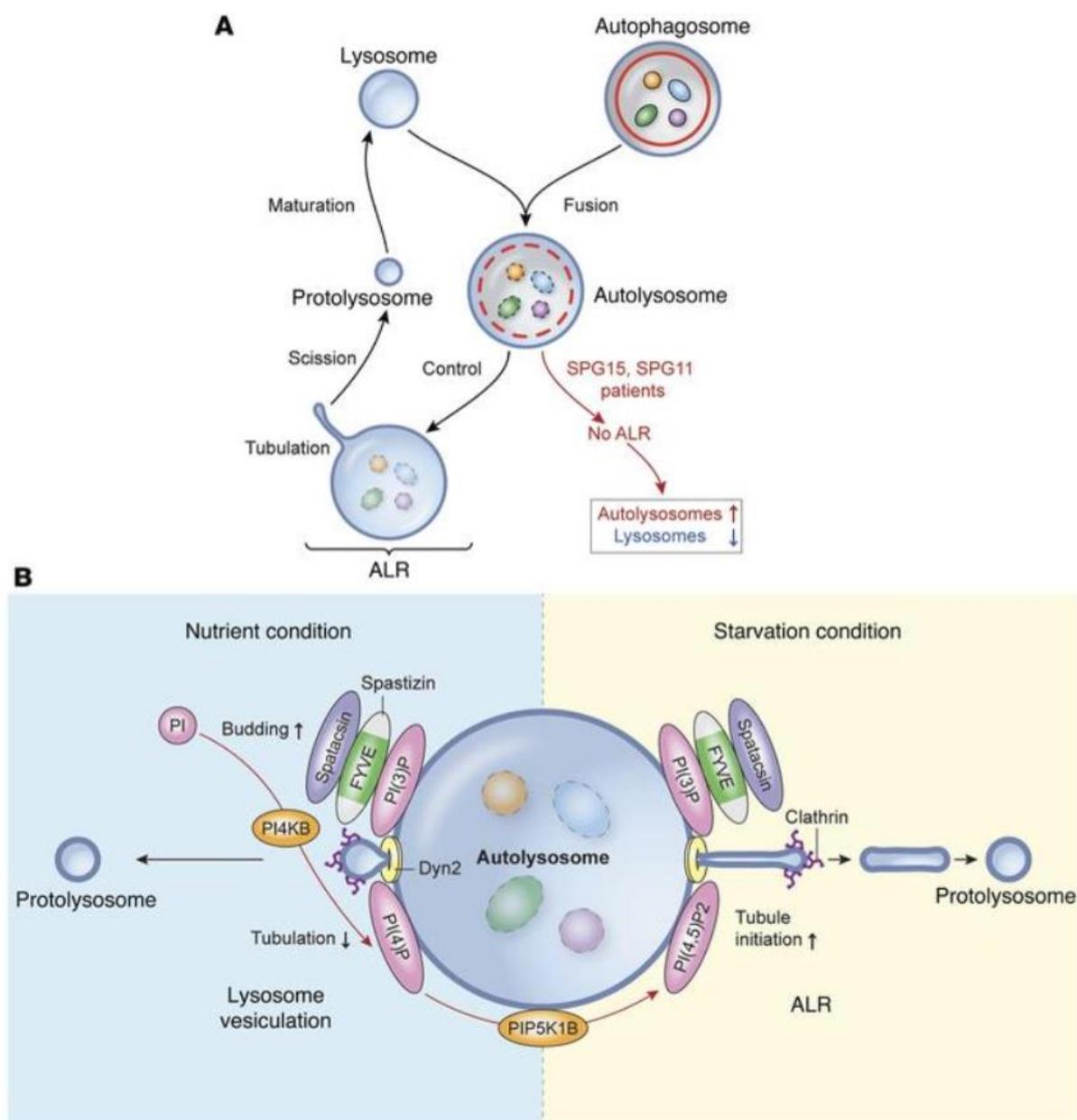


Figure 27 : Spatacsine et spastizine et la reformation des lysosomes (A) Modèle de la reformation des lysosomes dans des cellules contrôles et en absence de spatacsine ou de spastizine. La perte de fonction de ces protéines altère la reformation des lysosomes et induit une accumulation d'autolysosomes et une diminution du nombre de lysosomes. (B) Rôle proposé de la spatacsine et de la spastizine dans la reformation des lysosomes (Chang et al., 2014).

(v) Questions en suspens:

Les études de Chang et Varga impliquent la spatacsine dans le processus de reformation des lysosomes (Chang et al., 2014; Varga et al., 2015). Toutefois plusieurs questions restent en suspens. La spatacsine serait impliquée dans l'initiation de la tubulation mais son rôle moléculaire n'est pas bien défini. Les auteurs proposent que la spatacsine aurait, avec la spastizine, un rôle dans la formation des vésicules (en condition basale) ou de tubules (en condition de déprivation) en

formant un manteau protéique analogue à celui de la clathrine. En effet, la spatacsine pourrait avoir des structures secondaires semblables à celle des chaînes lourdes de clathrine (Hirst et al., 2013). Toutefois aucune expérience ne vient confirmer cette hypothèse et il apparaît nécessaire de poursuivre les investigations pour comprendre le rôle précis de la spatacsine dans la reformation des lysosomes.

L'étude du modèle murin, dans lequel la protéine est absente, semble confirmer le rôle de la spatacsine dans le mécanisme de reformation des lysosomes et son implication dans le processus neurodégénératif (Varga et al., 2015). Des accumulations de matériels autofluorescents sont observées dans les autolysosomes (Figure 28) et les auteurs proposent qu'ils résultent de la diminution du nombre de lysosome qui entrainerait une diminution de la dégradation des substrats autophagiques et qui s'accumulerait en conséquence. La nature de ces matériels autofluorescents n'est pas définie. De plus, le fait que ces accumulations soit la conséquence de l'altération de la reformation des lysosomes n'est pas prouvée expérimentalement. Ces accumulations au sein des lysosomes pourrait signifier que la PSH de type SPG11 fait partie des MSL. Plusieurs points doivent être clarifiés pour supporter cette hypothèse. Les MSL découlent d'une altération primaire de la fonction des lysosomes. Dans la pathologie SPG11 il n'est pas encore certain que la fonction primaire de la protéine soit lysosomale, la spatacsine n'ayant jamais été clairement localisée au niveau de l'organite. L'implication éventuelle d'autres fonctions de la spatacsine dans la maladie reste encore à explorer et la dissection des mécanismes moléculaires pourrait permettre la découverte de cibles thérapeutiques.

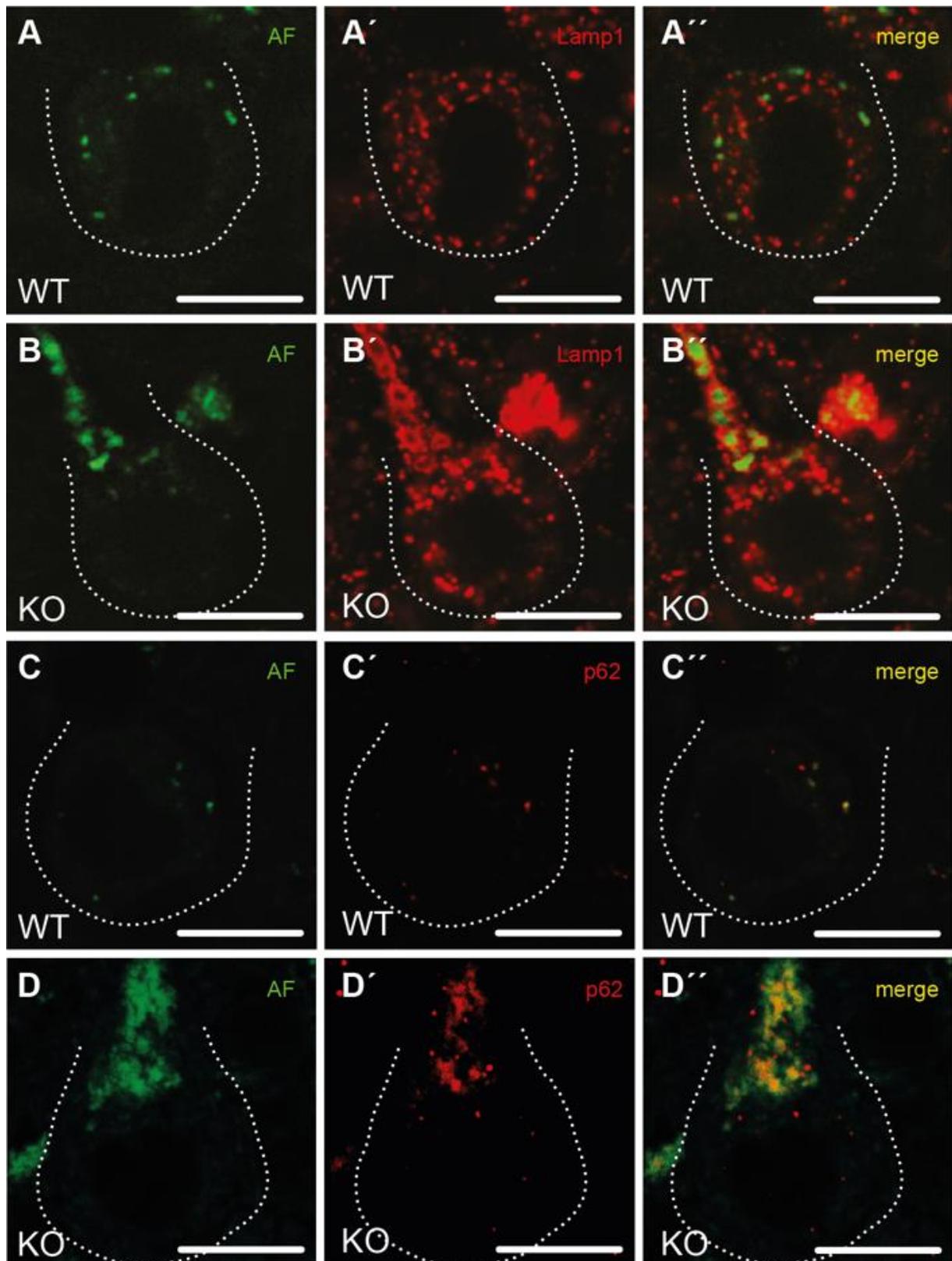


Figure 28 : Accumulations de matériels autofluorescents dans les autolysosomes. Les cellules de Purkinje KO montrent des accumulations autofluorescentes (AF) qui colocalisent avec les lysosomes (Lamp1) (A-B'') et le marqueur autophagiques p62 (C-D''). Ces images ont été effectuées sur des cellules de souris âgées de 16 mois. Barre d'échelle = 10 $\mu$ m (Varga et al., 2015).

## Objectifs :

Il est établi que les lysosomes ont une grande importance dans la fonction et la survie des neurones et du système nerveux central. Il est alors important d'étudier leurs dysfonctions pour comprendre les différents rôles des lysosomes et les mécanismes qui contrôlent leurs fonctions au sein des cellules et en particulier des neurones. La reformation des lysosomes est l'un de ces mécanismes. Elle permet de maintenir le réservoir de lysosomes fonctionnels dans la cellule. Dès lors il n'est pas étonnant que ce processus soit crucial pour la survie des neurones et que des altérations de ce processus soient impliquées dans des maladies neurodégénératives.

Ainsi, les objectifs de ma thèse étaient d'étudier les dysfonctions lysosomales participant à la neurodégénérescence et en particulier les altérations du processus de reformation des lysosomes, leurs causes et leurs conséquences pour les lysosomes et les cellules. Pour cela, j'ai utilisé des modèles cellulaires de la PSH de type SPG11. Cette pathologie neurodégénérative rare est causée par des mutations de type perte de fonction dans le gène *SPG11* qui code pour la spatacsine, une protéine qui joue un rôle dans la reformation des lysosomes comme nous l'avons vu précédemment. L'étude de ces modèles représente une opportunité de comprendre l'implication physiopathologique de la reformation des lysosomes et ses conséquences sur la fonction des lysosomes. Ces modèles permettent aussi de caractériser le rôle moléculaire de la spatacsine, aussi bien pour le recyclage des lysosomes que pour d'autres fonctions cellulaires qui pourrait être impliquées dans la PSH de type *SPG11*.

Afin de comprendre les mécanismes physiopathologiques liés à une perte de fonction de la spatacsine j'ai cherché à déterminer la nature des accumulations retrouvées dans des modèles de la pathologie et de comprendre si elles sont liées aux anomalies de recyclage des lysosomes. Ces accumulations indiquent-elles que la PSH de type SPG11 partage des mécanismes communs avec les MSL ? Peuvent-elles être des biomarqueurs de la pathologie et être à l'origine de futures approches thérapeutiques ?



## Résultats :

### I) Article 1 : Modèle murin de la PSH de type SPG11

**Loss of spatacsin function alters lysosomal lipid clearance leading to upper and lower motor neuron degeneration.**

Branchu J, **Boutry M**, Sourd L, Depp M, Leone C, Corriger A, Vallucci M, Esteves T, Matusiak R, Dumont M, Muriel MP, Santorelli FM, Brice A, El Hachimi KH, Stevanin G, Darios F.

[Neurobiol Dis.](#) 2017 Jun;102:21-37. doi: 10.1016/j.nbd.2017.02.007. Epub 2017 Feb 22.

#### 1) Introduction :

L'équipe d'accueil (CNRS UMR 7225 - Inserm U 1127 - UPMC-P6 UMR S 1127) se concentre sur l'identification des causes génétiques de maladies héréditaires rares et sur l'étude de leurs mécanismes physiopathologiques. Trois groupes de maladies sont étudiés : les formes familiales de la maladie de Parkinson, les dégénérescences fronto-temporales (FTI) et les dégénérescences spino-cérébelleuses. Ce dernier groupe comprend les ataxies spino-cérébelleuses ainsi que les paraplégies spastiques héréditaires.

L'implication du gène *SPG11* dans les PSH, de transmission autosomique récessive, a été découverte par l'équipe (Stevanin et al., 2007). Depuis l'équipe s'intéresse à la fonction de la spatacsine, codée par le gène *SPG11*. Plusieurs études ont été publiées par l'équipe:

- Une étude portant sur l'expression et les localisations tissulaires et cellulaires de la spatacsine (Murmu et al., 2011) ;
- La modélisation de la pathologie chez le poisson-zèbre par diminution de l'expression du gène *zspg11* via utilisation de morpholinos. Les larves de poissons dont l'expression du gène est diminuée ont une locomotion anormale et les branchements des axones, au niveau des jonctions neuromusculaires et des motoneurones de la moelle épinière sont anormaux. Le gène *zspg11* est requis pour le développement correct des axones des motoneurones de la moelle épinière (Martin et al., 2012) ;
- L'analyse anatomopathologique des cerveaux de deux patientes a mis en évidence des lésions et stigmates, comme des agrégats positifs pour le marqueur d'autophagie p62, similaires à ceux observés dans des cas de sclérose latérale amyotrophique confirmant le chevauchement clinique de la PSH de type *SPG11* avec d'autres pathologies (Denora et al., 2016).

En parallèle à ces différents projets, l'équipe a fait générer par l'Institut Clinique de la Souris (ICS) à Strasbourg un modèle murin dans lequel le gène *Sp11* est muté. Pour modéliser au mieux la

pathologie, deux mutations induisant chacune l'apparition d'un codon stop prématuré dans l'exon 32, ont été introduites. L'objectif de cette modélisation est d'étudier les mécanismes physiopathologiques qui sous-tendent la PSH de type SPG11.

Plusieurs études publiées à ce moment-là sur le rôle de la spatacsine, ou de ses interacteurs, suggéraient que des dysfonctions du système lysosomal sont en cause dans la PSH de type SPG11 (Chang et al., 2014; Hirst et al., 2015; Khundadze et al., 2013; Renvoisé et al., 2014). L'étude de ce modèle représentait ainsi un moyen de mieux comprendre le rôle de la spatacsine dans cette voie cellulaire. Au cours de nos travaux, une équipe concurrente a publié la première caractérisation d'un modèle murin de la pathologie en démontrant des altérations de la fonction des lysosomes et en proposant que le recyclage de ces organites est défectueux (Varga et al., 2015), consolidant l'hypothèse proposée d'un rôle de la spatacsine dans la reformation des lysosomes (Chang et al., 2014). Dans ce modèle les premiers troubles moteurs et phénotypiques n'étaient observés que tardivement (13 mois d'âge) et certaines des caractéristiques de la pathologie humaine n'ont pas été observées. Nous avons réalisé une analyse plus poussée des phénotypes moteurs et cognitifs chez les souris mutantes ainsi que des altérations cellulaires qui pourraient être responsables de la neurodégénérescence.

La caractérisation phénotypique et histopathologique du modèle a été réalisée par le Dr. Julien Branchu, post-doctorant dans l'équipe. J'ai pour ma part utilisé des fibroblastes de peau et des neurones isolés à partir d'embryons de souris sauvages et mutées pour étudier les dysfonctions cellulaires causées par l'absence de spatacsine.

## 2) Résumé :

L'analyse phénotypique du modèle murin de la PSH de type SPG11 développé par le laboratoire a mis en évidence des altérations motrices et cognitives chez les souris dont le gène *Spg11* est muté (notée *Spg11*<sup>-/-</sup>). Ces altérations ont été détectées à des âges précoces : les troubles moteurs ont été observés dès l'âge de 6 semaines tandis que les troubles cognitifs ont été mis en évidence à partir d'un âge de 4 mois.

Ces troubles s'aggravent avec le temps et s'accompagnent d'une perte neuronale, commençant à partir de 8 mois, dans plusieurs régions du système nerveux dont le cortex moteur, le cervelet, l'hippocampe et la moelle épinière. Cela conduit à une atrophie globale du cerveau à un âge avancé des souris. Les motoneurons de la moelle épinière dégèrent eux aussi et nous avons remarqué, à des stades avancés de la maladie (16 mois), la présence de jonctions neuromusculaires fragmentées ainsi que d'une atrophie musculaire. Ainsi, notre modèle murin récapitule les principales caractéristiques de la pathologie humaine.

Des agrégats autofluorescents ont été retrouvés dans les motoneurones du cortex moteur et ces agrégats sont entourés par un marquage des lysosomes (Lamp1). La taille et le nombre de ces agrégats augmentent avec le temps dans les souris mutées et ils ne sont présents chez les souris sauvages qu'à des âges avancés. Ces résultats suggèrent que les agrégats autofluorescents sont des accumulations de matériels dans les lysosomes. Comme nous avons pu mettre en évidence la présence de ces agrégats dans les neurones avant que la perte neuronale commence nous avons émis l'hypothèse que des dysfonctions des lysosomes seraient à l'origine de la pathologie.

Pour comprendre le rôle de ces accumulations dans les lysosomes nous avons examiné des neurones du cortex moteur des souris mutantes par microscopie électronique en transmission. Des accumulations de lipides dans des structures de type lipofuscine ont été mises en évidence chez des souris dès l'âge de 2 mois. La taille de ces structures et l'accumulation des lipides progressent avec l'âge, suggérant qu'elles ont un lien avec la maladie. Dans les fibroblastes des souris, en absence de spatacsine, la proportion de lysosomes anormaux présentant des accumulations de matériels non digérés est augmentée par rapport aux fibroblastes de souris sauvages. L'utilisation d'un marqueur fluorescent des lipides m'a permis de montrer que ces matériels non digérés sont, au moins en partie, de nature lipidique. Le transport des lipides des lysosomes vers les autres organites, dont les gouttelettes lipidiques semble diminué comme le suggère la diminution du nombre de ces organites chez les cellules *Spg11*<sup>-/-</sup>. Nous avons pu confirmer ces observations dans des neurones embryonnaires.

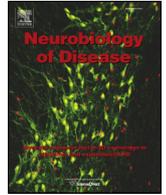
Nos résultats suggèrent donc que des altérations des lysosomes et du métabolisme des lipides sont à l'origine de la PSH de type SPG11 et que la spatacsine joue un rôle dans le recyclage des lipides.



### 3) Article 1 :

**Loss of spatacsin function alters lysosomal lipid clearance leading to upper and lower motor neuron degeneration**





## Loss of spatascins function alters lysosomal lipid clearance leading to upper and lower motor neuron degeneration



Julien Branchu<sup>a,b,c,d</sup>, Maxime Boutry<sup>a,b,c,d</sup>, Laura Sourd<sup>a,b,c,d,e</sup>, Marine Depp<sup>a,b,c,d,e</sup>, Céline Leone<sup>a,b,c,d,e</sup>, Alexandrine Corriger<sup>a,b,c,d,e</sup>, Maeva Vallucci<sup>a,b,c,d,e</sup>, Typhaine Esteves<sup>a,b,c,d,e</sup>, Raphaël Matusiak<sup>a,b,c,d</sup>, Magali Dumont<sup>a,b,c,d</sup>, Marie-Paule Muriel<sup>a,b,c,d</sup>, Filippo M. Santorelli<sup>f</sup>, Alexis Brice<sup>a,b,c,d</sup>, Khalid Hamid El Hachimi<sup>a,b,c,d,e</sup>, Giovanni Stevanin<sup>a,b,c,d,e,\*</sup>, Frédéric Darios<sup>a,b,c,d,\*</sup>

<sup>a</sup> Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, UMR S 1127, F-75013 Paris, France

<sup>b</sup> Inserm, U1127, F-75013 Paris, France

<sup>c</sup> CNRS, UMR 7225, F-75013 Paris, France

<sup>d</sup> Institut du Cerveau et de la Moelle épinière, ICM, F-75013 Paris, France

<sup>e</sup> Ecole Pratique des Hautes Etudes, PSL Research University, Laboratoire de Neurogénétique, F-75013 Paris, France

<sup>f</sup> Molecular Medicine, IRCCS Stella Maris Foundation, Calambrone, I-56100 Pisa, Italy

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 26 October 2016

Revised 10 January 2017

Accepted 20 February 2017

Available online 22 February 2017

#### Keywords:

Motor neuron  
Neurodegeneration  
Lysosome  
Lipids  
SPG11

### ABSTRACT

Mutations in *SPG11* account for the most common form of autosomal recessive hereditary spastic paraplegia (HSP), characterized by a gait disorder associated with various brain alterations. Mutations in the same gene are also responsible for rare forms of Charcot-Marie-Tooth (CMT) disease and progressive juvenile-onset amyotrophic lateral sclerosis (ALS). To elucidate the physiopathological mechanisms underlying these human pathologies, we disrupted the *Spg11* gene in mice by inserting stop codons in exon 32, mimicking the most frequent mutations found in patients. The *Spg11* knockout mouse developed early-onset motor impairment and cognitive deficits. These behavioral deficits were associated with progressive brain atrophy with the loss of neurons in the primary motor cortex, cerebellum and hippocampus, as well as with accumulation of dystrophic axons in the corticospinal tract. Spinal motor neurons also degenerated and this was accompanied by fragmentation of neuromuscular junctions and muscle atrophy. This new *Spg11* knockout mouse therefore recapitulates the full range of symptoms associated with *SPG11* mutations observed in HSP, ALS and CMT patients. Examination of the cellular alterations observed in this model suggests that the loss of spatascins leads to the accumulation of lipids in lysosomes by perturbing their clearance from these organelles. Altogether, our results link lysosomal dysfunction and lipid metabolism to neurodegeneration and pinpoint a critical role of spatascins in lipid turnover.

© 2017 The Authors. Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

### 1. Introduction

Hereditary spastic paraplegias (HSP) constitute the second most common group of motor neuron diseases. They are characterized by progressive bilateral weakness, spasticity and the loss of vibration sensation in the lower limbs. These symptoms are mostly due to the degeneration of upper motor neuron axons in the corticospinal tracts (Harding, 1983). The main causes of autosomal recessive HSP are mutations in the *SPG11* gene. Symptoms of *SPG11* patients generally appear

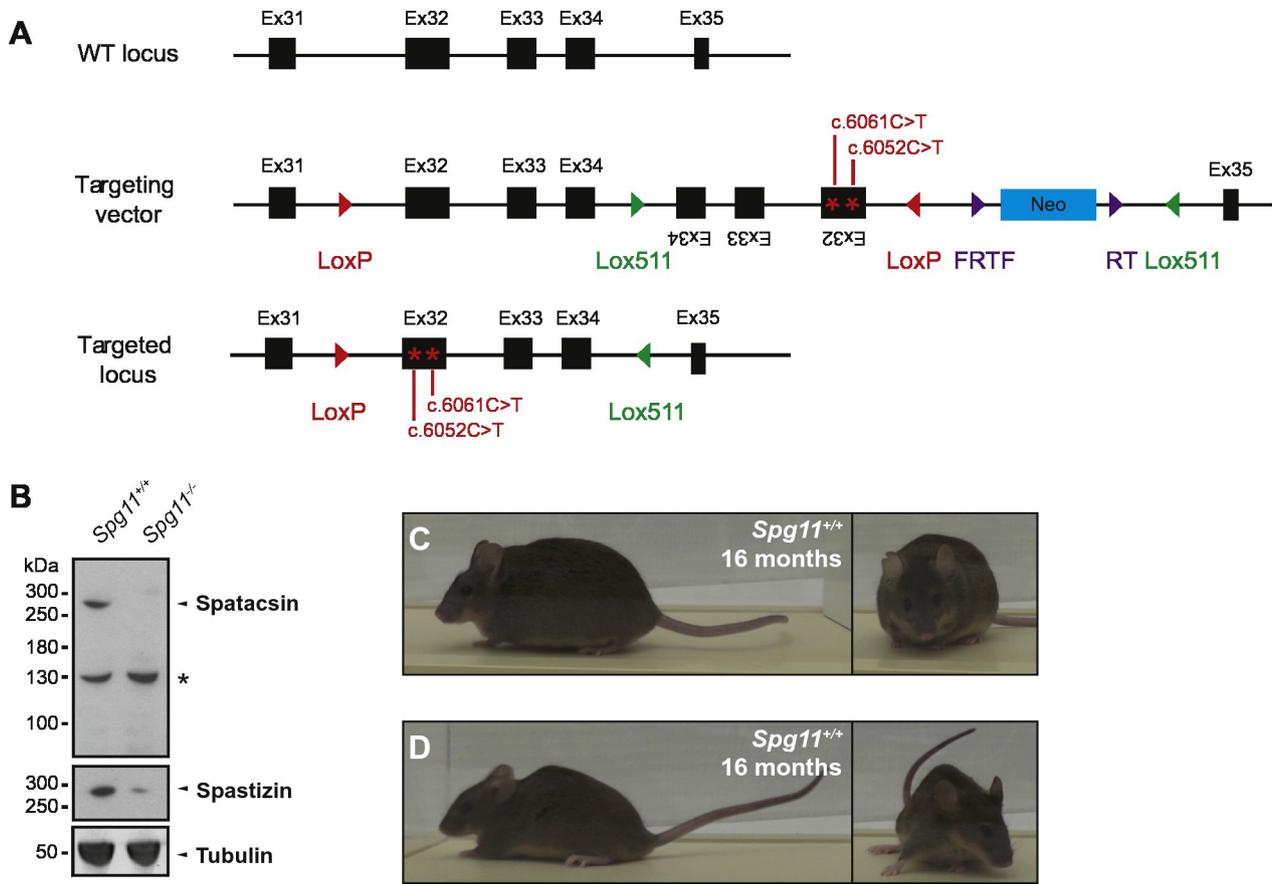
during the first decade of life and, in addition to spastic gait disorder, include cognitive impairment, mental retardation, peripheral neuropathy, cerebellar ataxia, parkinsonism and retinal degeneration (Anheim et al., 2009; Puech et al., 2011; Stevanin et al., 2008). These symptoms are often associated with progressive thinning of the *corpus callosum* and white matter hyperintensities by brain magnetic resonance imaging (MRI) (Hehr et al., 2007; Stevanin et al., 2007). Mutations in *SPG11* also account for autosomal-recessive Charcot Marie Tooth (CMT) disease (Montecchiani et al., 2016) and slowly progressive juvenile-onset amyotrophic lateral sclerosis (ALS) without cognitive impairment or abnormal MRI (Daoud et al., 2012; Orlacchio et al., 2010). In agreement, a recent neuropathological analysis of the brain from two patients with the full-blown *SPG11* phenotype showed that the pathology partially mimics ALS lesions (Denora et al., 2016).

*SPG11* encodes a 2443-amino acid protein called spatascins. Regardless of the associated phenotype, the vast majority of mutations

\* Corresponding authors at: Institut du Cerveau et de la Moelle épinière, Inserm U1127, CNRS UMR 7225, UPMC UMR S 1127, Hôpital de la Salpêtrière, 47, boulevard de l'Hôpital, 75013, France.

E-mail addresses: [giovanni.stevanin@upmc.fr](mailto:giovanni.stevanin@upmc.fr) (G. Stevanin), [frederic.darios@upmc.fr](mailto:frederic.darios@upmc.fr) (F. Darios).

Available online on ScienceDirect ([www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)).



**Fig. 1.** *Spg11* knockout causes a progressive motor deficit in mice. (A) Diagram showing the genomic structure of the *Spg11* gene (top), the targeting vector (middle) and the targeted locus upon excision of the neomycin resistance cassette and action of the Cre-recombinase (bottom). The mutations introduced were c.6052C>T (p.Arg2018\*), corresponding to c.6091C>T (p.Arg2031\*) in human and c.6061C>T (p.Gln2021\*), corresponding to c.6100C>T (p.Arg2034\*) in human. (B) Western blot of brain protein extracts showing the absence of spatacsin in *Spg11*<sup>-/-</sup> samples and the strong decrease in the levels of spastizin. Representative image of three independent experiments. \*: non-specific band. (C and D), Pictures showing an *Spg11*<sup>+/+</sup> (C) and *Spg11*<sup>-/-</sup> mouse (D) at 16 months of age. Knockout mice had an abnormal posture and kyphosis of the spine.

identified in SPG11 patients are nonsense or frameshift mutations, which are predicted to lead to the loss of function of spatacsin (Montecchiani et al., 2016; Orlacchio et al., 2010; Stevanin et al., 2008). The nature of the mutation is not responsible for the variability in phenotype as intrafamilial phenotypic variability has been observed, with the same mutations leading to juvenile ALS in one patient and HSP with a thin corpus callosum in his sibling (Daoud et al., 2012).

Spatacsin interacts with proteins involved in membrane-trafficking (Hirst et al., 2013), among which AP5Z1 (SPG48) and spastizin/zFYVE26 (SPG15) are also implicated in hereditary spastic paraplegia, when mutated (Hanein et al., 2008; Slabicki et al., 2010). The symptoms of patients mutated in the *SPG15* or *SPG11* gene are very similar (Hanein et al., 2008), in agreement with their involvement in the same cellular mechanisms. Indeed, recent investigations in fibroblasts of SPG11 and SPG15 patients (Renvoise et al., 2014) and studies in mouse models

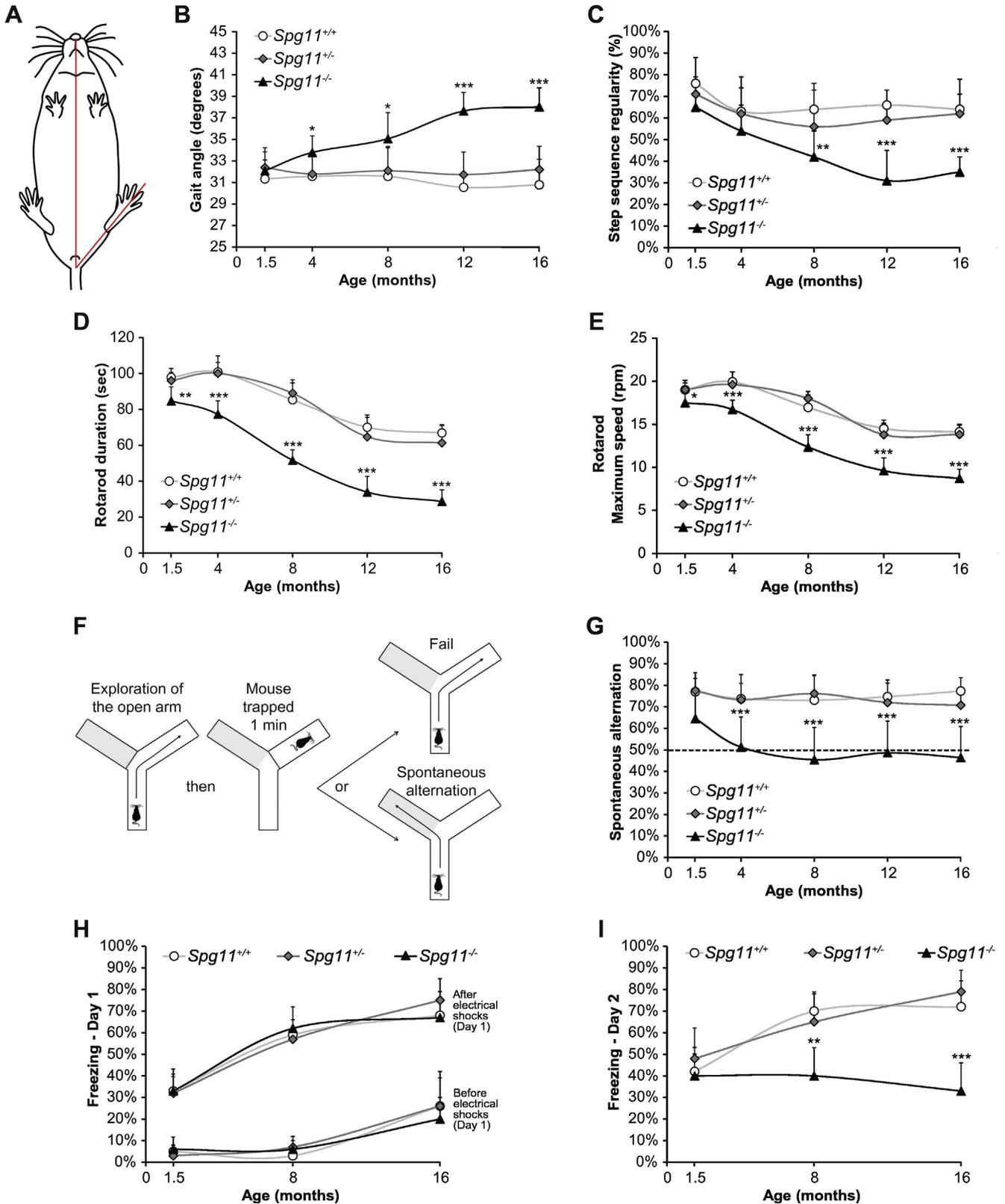
have suggested that the loss of spatacsin or spastizin alters the function of the endolysosomal system (Khundadze et al., 2013; Varga et al., 2015). Furthermore, spatacsin and spastizin have been shown to be involved in lysosome-recycling after fusion with autophagosomes in HeLa cells (Chang et al., 2014). In agreement, an *Spg11* knockout mouse model, obtained by inserting a genetrap cassette in the first intron of the *Spg11* gene, showed that the loss of spatacsin impairs autolysosome reformation, ultimately leading to depletion of lysosomes and impaired autophagic clearance (Varga et al., 2015). This *Spg11* model reproduced the neurodegeneration in the motor cortex and cerebellum observed in SPG11 patients, but did not show any early-onset motor or cognitive deficits, amyotrophy or alterations of the *corpus callosum* as frequently observed in SPG11 patients.

We therefore extensively characterized a new *Spg11* knockout mouse model. These *Spg11*<sup>-/-</sup> animals displayed early-onset motor

**Fig. 2.** *Spg11* knockout mice develop a progressive spastic and ataxic gait disorder. (A and B) Gait angle sketch (A) and values recorded (B) during a forced walk on a treadmill. The gait angle decreased in *Spg11*<sup>-/-</sup> mice from four months of age ( $n \geq 12$  animals/genotype/age; Kruskal-Wallis test; \* $p \leq 0.05$  and \*\*\* $p \leq 0.001$ ). (C) Step sequence regularity values recorded during a forced walk on a treadmill. *Spg11*<sup>-/-</sup> mice exhibited motor coordination impairment from eight months of age ( $n \geq 12$  animals/genotype/age; Kruskal-Wallis test; \*\* $p \leq 0.01$  and \*\*\* $p \leq 0.001$ ). (D and E) Rotarod duration (D) and maximum speed (E). The duration and maximum speed of *Spg11*<sup>-/-</sup> in accelerated rotarod testing was less than those of heterozygous and control mice at as early as six weeks of age ( $n \geq 12$  animals/genotype/age; Kruskal-Wallis test; \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$  and \*\*\* $p \leq 0.001$ ). (F and G) The Y-maze principle (F) and spontaneous alternation values (G). Knockout mice did not show a preference between the visited and the unknown arm of the maze from four months of age ( $n \geq 12$  animals/genotype/age; Kruskal-Wallis test; \*\*\* $p \leq 0.001$ ). This altered cognitive behavior underlines a spatial learning or a memory deficit. (H and I) Fear conditioning. Percentage of time spent in a frozen posture on day 1 before and after electrical shocks (H). There was no obvious learning deficit during the conditioning of the mice at any age. Percentage of time spent in a frozen posture on day 2, without any electrical shocks, after conditioning (I). Although the task was learned, knockout mice spent less time in a frozen position from eight months of age, indicating a cognitive and memory deficit ( $n \geq 10$  animals/genotype/age; Kruskal-Wallis test; \*\* $p \leq 0.01$  and \*\*\* $p \leq 0.001$ ).

and cognitive deficits as well as signs of peripheral neuropathy, recapitulating the human disease. These deficits were paralleled by neurodegeneration in the motor cortex, cerebellum, hippocampus, and spinal cord as well as alterations of neuromuscular junctions and muscular atrophy. This degeneration was accompanied by an accumulation of lipid

material in lysosomal structures, similar to the observations made in human SPG11 brains (Denora et al., 2016). Investigation of primary cultures of mouse embryonic fibroblasts and cortical neurons showed that this accumulation was due to the loss of lipid clearance in lysosomes normally promoted by spatacsin.



## 2. Results

We investigated the physiological role of spatacsin by disrupting the expression of *Spg11* in mice by inserting two successive stop codons in exon 32 of the gene (Fig. 1A), the most frequently mutated exon in SPG11 patients (Stevanin et al., 2008; Stevanin et al., 2007). When heterozygous mice (*Spg11*<sup>+/-</sup>) were mated, knockout mice were generated in the expected Mendelian ratio and were viable. They developed normally, were fertile and had survival rates similar to those of their wild-type and heterozygous littermates (data not shown). We used Western blotting to verify that the disruption of the *Spg11* gene resulted in spatacsin depletion (Fig. 1B). Spatacsin has been shown to interact with spastizin/zFYVE26. Thus, we tested whether the loss of spatacsin affected spastizin expression levels. As observed in patient fibroblasts (Renvoise et al., 2014), spastizin levels in *Spg11*<sup>-/-</sup> brain samples were  $9.0\% \pm 3.8\%$  ( $n = 3$ ) of those of control (*Spg11*<sup>+/+</sup>) brain samples (Fig. 1B).

*Spg11*<sup>-/-</sup> mice had no dysmorphic features or abnormalities up to the age of eight months relative to control littermates (data not shown). However, at 16 months, the age at which we stopped the study for ethical reasons, most of the knockout mice had an abnormal posture with spread hind limbs, lower pelvic elevation and pronounced kyphosis of the thoracic spine (Fig. 1C and D).

### 2.1. *Spg11*-knockout mice develop an early-onset motor deficit

We evaluated the consequences of the loss of function of spatacsin on motor functions by performing a series of complementary behavioral tests. From the age of four months onwards, *Spg11*<sup>-/-</sup> mice displayed a progressive gait disorder and ataxia, which were quantified by recording the walking of mice on a treadmill at moderate speed ( $10 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ ) (Fig. 2A, B and C). This test showed that gait angle, the position of the hind paws relative to the axis of the body, was significantly higher in knockout mice than in control mice, from the age of four months onwards (Fig. 2A and B). With age, *Spg11*<sup>-/-</sup> mice displayed a spreading of the hind limbs and began to drag their feet slightly during a forced walk (data not shown). We evaluated a possible ataxic gait by analyzing step sequence regularity, which reflects motor coordination. The regularity of the step sequence of *Spg11*<sup>-/-</sup> mice was much lower than that of *Spg11*<sup>+/+</sup> mice from eight months of age (Fig. 2C). The motor deficit was even more marked in the rotarod test, a forced-run-paradigm. *Spg11*<sup>-/-</sup> mice displayed the first signs of motor impairment at the age of only six weeks in this test. The knockout mice remained on an accelerating rotarod for significantly less time than heterozygous and control mice, and could not reach the same maximum speed on the rotarod apparatus (Fig. 2D and E). This motor deficit worsened with time. Motor performance decreased with age in control and heterozygous mice, but was systematically better in these mice than in the knockout mice.

### 2.2. Loss of spatacsin causes a cognitive deficit in mice

We subjected mice to the Y-maze spontaneous-alternation test to evaluate any cognitive deficits. This test relies on the tendency of mice to explore new environments and is used to monitor spatial memory (Hughes, 2004) (Fig. 2F). During the first phase, mice were allowed to freely explore the only open arm of the maze and were confined there for one minute by closing a door behind them. During the second phase, they were placed at the entrance of the maze with both arms open. As expected, *Spg11*<sup>+/+</sup> and *Spg11*<sup>+/-</sup> mice naturally chose to explore the unknown arm of the maze, a new environment, in ~75% of the trials, rather than the part of the maze that had already been explored. In contrast, *Spg11*<sup>-/-</sup> mice showed a lower tendency to enter the unknown arm than the *Spg11*<sup>+/+</sup> mice at six weeks of age, and from four months on, the *Spg11*<sup>-/-</sup> mice showed no preference between the visited and unknown arms (Fig. 2G), suggesting an alteration in short-term

spatial working memory in the knockout mice. We performed a fear conditioning experiment, in which a neutral context was associated with two aversive electric shocks, to determine whether different types of memory were affected. Freezing normally reflects the stress behavior in response to an aversive stimulus. The freezing baseline slightly increased with age, but we observed no significant differences between knockout mice and wild-type or heterozygous littermates. The two electric shocks triggered a marked increase of freezing in all groups (Fig. 2H). The next day, the percentage of time that wild-type and heterozygous mice spent in a frozen posture without an electric shock was high, showing that the task was learned. In contrast, *Spg11*<sup>-/-</sup> mice spent less time in a frozen posture from eight months on (Fig. 2I), suggesting that the knockout mice had a long-term emotional memory deficit.

### 2.3. Loss of spatacsin causes cortical, cerebellar and hippocampal atrophy

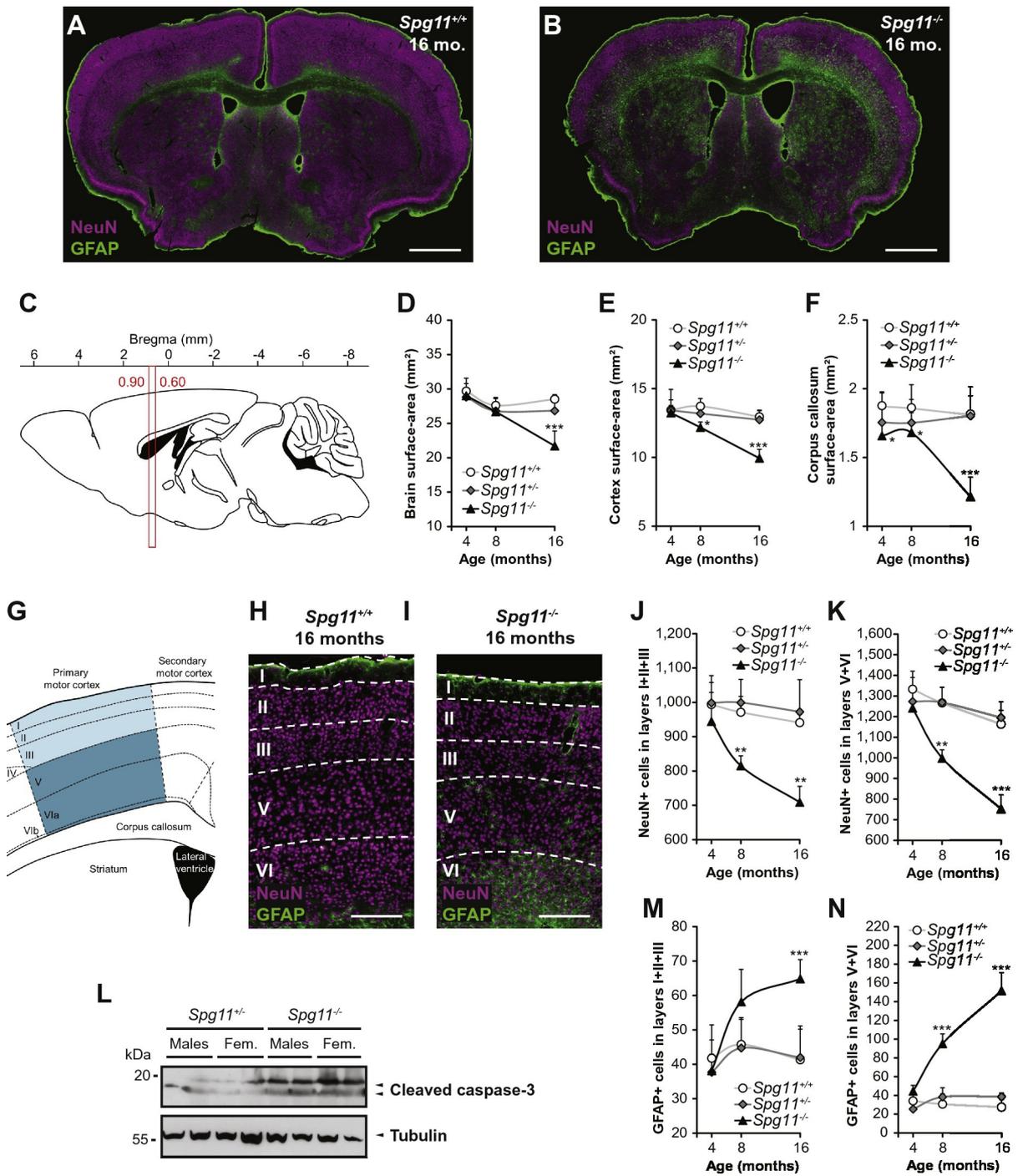
We investigated whether the observed behavioral phenotypes resulted from neurodegeneration by analyzing the cortex, cerebellum and hippocampus of *Spg11*<sup>-/-</sup> mice. We measured the surface-areas of the brain and cortex on coronal brain sections (Bregma 0.90 to 0.60 mm) (Fig. 3A–E). The surface-area of the brain was lower in the *Spg11*<sup>-/-</sup> than wild type mice only at 16 months (Fig. 3D), but the surface-area of the cortex was lower from eight months onwards (Fig. 3E). The surface-area of the *corpus callosum* was affected after only four months (Fig. 3F). We then determined the number of cortical neurons in the primary motor cortex by immunostaining coronal sections of the brain for NeuN (Fig. 3G, H, and I). The number of neurons in the cortical layers was unaffected in four-month-old *Spg11*<sup>-/-</sup> mice, but from the age of eight months on, it was significantly lower than in *Spg11*<sup>+/+</sup> mice (Fig. 3J and K). Neuronal degeneration worsened with time and was accompanied by astrogliosis, as shown by an increase in GFAP-positive cells (Fig. 3H, I, M, and N). We also observed increased levels of active caspase-3 in the cortex of *Spg11*<sup>-/-</sup> mice, suggesting that neuronal death occurs via an apoptotic pathway (Fig. 3L).

Similarly, we measured the surface-areas of coronal sections of the cerebellum (Bregma -6.00 to -6.30 mm) (Fig. 4A) and showed that this structure was atrophied in *Spg11*<sup>-/-</sup> mice from eight months on (Fig. 4B). Accordingly, the degeneration of Purkinje cells, labeled by Calbindin-immunostaining, followed a similar time course and was also accompanied by marked astrogliosis (Fig. 4C, D, and E).

As the *Spg11*<sup>-/-</sup> mice displayed memory deficits, we examined the hippocampus by labeling neurons with anti-NeuN antibodies and astrocytes with anti-GFAP antibodies (Fig. 4G and H). We measured the surface-area of the hippocampus in brain coronal sections (Bregma -1.70 to -2.00 mm) (Fig. 4F). *Spg11*<sup>-/-</sup> mice exhibited atrophy of the hippocampus relative to the control mice from four months on (Fig. 4G–I). The surface-areas of the granule layer of the CA1 region and the dentate gyrus were lower in the knockout than control mice from four months of age. The surface area of the granule layer in the CA2 and CA3 regions was lower in the *Spg11*<sup>-/-</sup> than control mice only at 16 months of age (Fig. 4J–L). We observed no astrocyte proliferation in these structures.

### 2.4. *Spg11*<sup>-/-</sup> mice show spinal cord atrophy and axonal degeneration in the corticospinal tract

We examined transverse, 0.5  $\mu\text{m}$  semi-thin sections of cervical and lumbar spinal cords of mice of different ages by toluidine blue-staining (Fig. 5A and B). The surface-area and structure of the whole spinal cord of knockout and control mice were similar at four months of age. However, by 16 months of age, the whole spinal cord of *Spg11*<sup>-/-</sup> mice showed significant atrophy compared to the *Spg11*<sup>+/+</sup> mice (Cervical -31.5%, lumbar -29.2%) (Fig. 5A–F), as in the brain and cerebellum. Accordingly, at that stage, the surface-areas of the white and gray matter were lower in both the cervical and lumbar sections of *Spg11*<sup>-/-</sup> spinal cords (Fig. 5E and F). At eight months of age, the surface-areas of the white and gray matter in the cervical section of knockout mice were



**Fig. 3.** Loss of spatacsin causes severe cortical damage. (A and B) Brain coronal slices of *Spg11*<sup>+/+</sup> (A) and *Spg11*<sup>-/-</sup> (B) mice at 16 months of age. GFAP (green; astrocyte marker), and NeuN (magenta; neuronal marker) immunostaining. Scale bars: 1 mm. (C) Sagittal view of mouse brain showing the location of the coronal cut sections between Bregma 0.90 and 0.60 mm. (D–F) Brain (D), cortex (E) and corpus callosum (F) surface-areas. The surface-areas of the cortex and corpus callosum decreased from eight and four months, respectively, prior to general brain atrophy ( $n \geq 5$  slices/animal and  $n \geq 5$  animals/genotype/age; Kruskal-Wallis test; \* $p \leq 0.05$  and \*\*\* $p \leq 0.001$ ). (G) Diagram of the primary motor cortex layers between Bregma 0.90 and 0.60 mm. (H and I) NeuN (magenta) and GFAP (green) immunostaining in the primary motor cortex of *Spg11*<sup>+/+</sup> (H) and *Spg11*<sup>-/-</sup> (I) mice at 16 months of age. Scale bars: 200  $\mu$ m. (J and K) Quantification of total NeuN-positive cells in the primary motor cortex layers I + II + III (J) and V + VI (K). Immunostaining revealed a significant reduction in the number of neurons from layers I–VI of the motor cortex in knockout mice from eight months of age. ( $n \geq 10$  slices/animal and  $n \geq 5$  animals/genotype/age; Kruskal-Wallis test; \*\* $p \leq 0.01$  and \*\*\* $p \leq 0.001$ ). (L) Western blot of 16-month-old *Spg11*<sup>+/+</sup> and *Spg11*<sup>-/-</sup> brain samples showing the presence of cleaved (active) caspase-3 in the absence of spatacsin. (M and N) Quantification of total GFAP-positive cells in the primary motor cortex layers I + II + III (M) and V + VI (N). Neuron loss was accompanied by marked astrogliosis ( $n \geq 10$  slices/animal and  $n \geq 5$  animals/genotype/age; Kruskal-Wallis test; \*\*\* $p \leq 0.001$ ).

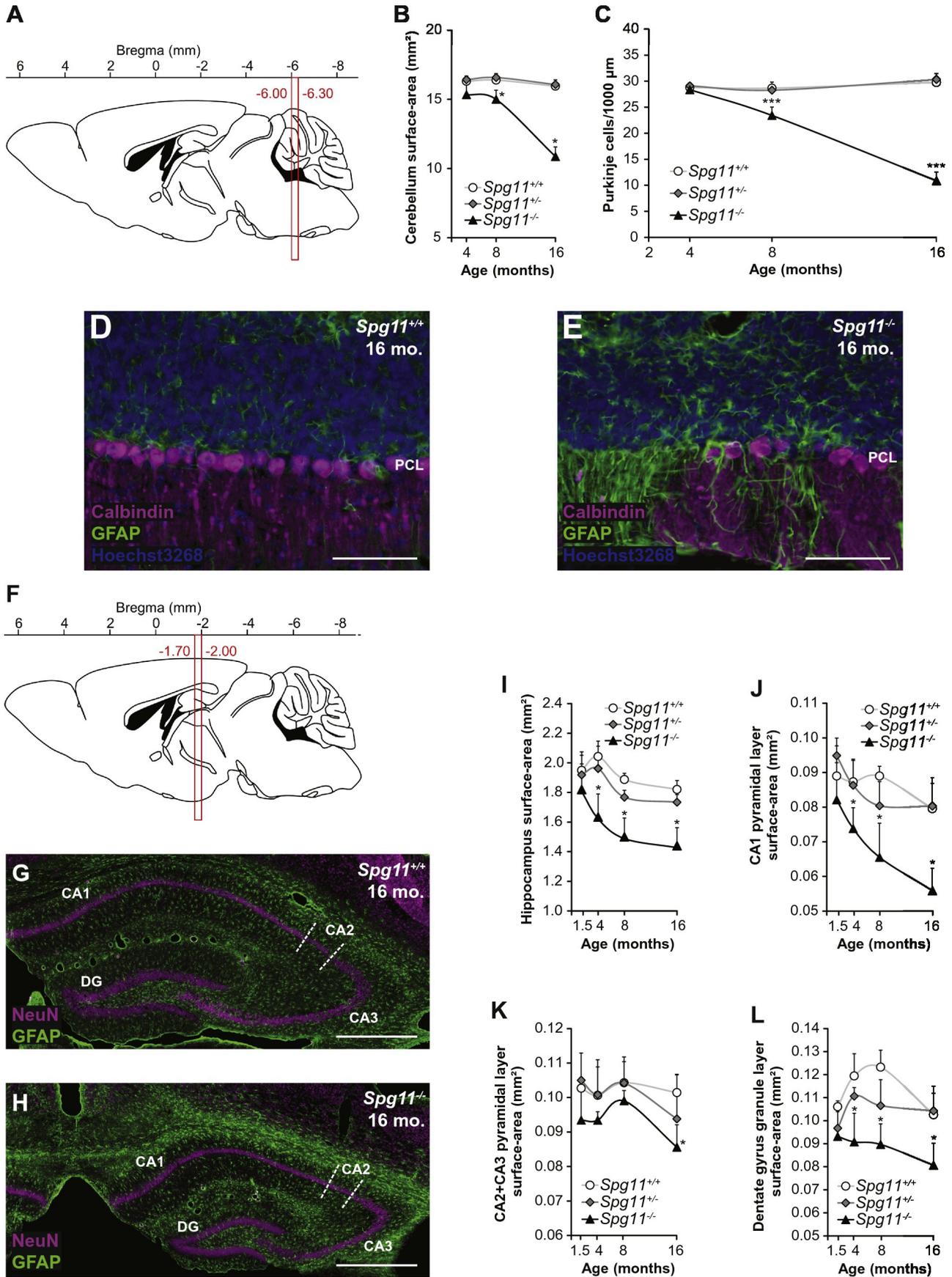
similar to those of the control mice (Fig. 5C). In contrast, at that age, lumbar sections already showed the first signs of atrophy, with a slightly lower surface-area of the white matter than in controls (Fig. 5D).

We then assessed whether the degeneration of the cortico-spinal tracts that occurs in the human SPG11 disease, also occurs in *Spg11*

knockout mice. We found that the distribution of the nervous fibers of the corticospinal tract was different in *Spg11*<sup>-/-</sup> mice compared to that of *Spg11*<sup>+/+</sup> mice (Fig. 5G and H). The percentage of small axons (<5  $\mu$ m<sup>2</sup>) was significantly higher in *Spg11*<sup>-/-</sup> mice from eight months of age than in age-matched controls (Fig. 5K). In parallel, the percentage of large axons (>15  $\mu$ m<sup>2</sup>) was significantly lower in the knockout-mice.

This pathological phenotype worsened with time (Fig. 5L). In addition, the corticospinal tract of knockout mice exhibited numerous dystrophic axons from eight months of age (Fig. 5H and N). On the contrary, the

structure and organization of an ascending tract, the *cuneate fasciculus*, were similar between *Spg11<sup>-/-</sup>* and *Spg11<sup>+/+</sup>* mice of any age (Fig. 5I, J, M, and O).



## 2.5. Loss of spatacsin causes loss of lower motor neurons and myofibers

We evaluated the loss of spinal motor neurons by staining sections of lumbar spinal cord with an anti-choline acetyl transferase (ChAT) antibody (Fig. 6A and B). The number of motor neurons decreased in the spinal cord of *Spg11*<sup>-/-</sup> mice from eight months onwards (Fig. 6C). Measurement of the cell body size in these neurons showed that the number of large motor neurons, with a surface-area >600 μm<sup>2</sup>, was lower in knockout animals, whereas the number of small motor neurons (<300 μm<sup>2</sup>) was unaffected (Fig. 6D–F). We then examined the neuromuscular junctions (NMJ) of the *soleus* muscle, staining the post-synaptic compartment with α-bungarotoxin and the presynaptic compartment with anti-neurofilament and anti-synaptophysin antibodies (Fig. 6G–I). The size of the NMJ decreased and the number of fragmented NMJs increased in *Spg11*<sup>-/-</sup> mice from eight months on (Fig. 6J, and K). This alteration of NMJs was associated with slight and progressive atrophy of the *soleus* muscle from the age of eight months in *Spg11*<sup>-/-</sup> mice (Fig. 6L and M). This atrophy resulted from a decrease in the number of myofibers in the *soleus* muscle of *Spg11*<sup>-/-</sup> mice and a slight decrease in their surface-area (Fig. 6N and O), suggesting that these animals exhibit progressive amyotrophy. We observed similar results in the *tibialis* and *plantaris* skeletal muscles (data not shown). Accordingly, a grip test that measures traction strength showed that *Spg11*<sup>-/-</sup> mice lost muscular strength in both forelimbs and hind limbs from 12 months on (Fig. 6P).

## 2.6. Loss of spatacsin leads to early lysosomal dysfunction

We then evaluated the cellular alterations underlying neurodegeneration in *Spg11*<sup>-/-</sup> mice. Autofluorescent intracellular material accumulated in the neurons of the cerebral cortex in *Spg11*<sup>-/-</sup> mice. We observed this accumulation in six week-old knockout mice, whereas large autofluorescent particles were not detected until the age of 16 months in control mice. At this stage, the deposits in the motor neurons of knockout mice were more numerous and larger than those in control mice (Fig. Sup 1A). We did not detect autofluorescence upon excitation at 635 nm (Fig. Sup 1B), so it was possible to analyze its colocalization with various markers. Lamp1 immunoreactivity surrounded the autofluorescent aggregates (Fig. 7A), suggesting that the loss of spatacsin altered lysosomal function. Lysosomes play a key role in autophagosome degradation, and lysosomal dysfunction is thought to lead to the accumulation of autophagolysosomes (Menzies et al., 2015). We therefore investigated whether the autofluorescent aggregates colocalized with p62, a marker of autophagy substrates. We observed colocalization of p62 with autofluorescent aggregates only in *Spg11*<sup>-/-</sup> mice at 16 months of age (Fig. 7B). We observed similar autofluorescent aggregates surrounded by Lamp1 immunostaining in Purkinje cells in the cerebellum (Fig. Sup 2A and B) and in spinal motor neurons (data not shown) of 16 month-old *Spg11*<sup>-/-</sup> mice. The autophagy marker p62 also colocalized with the autofluorescent aggregates in Purkinje cells of *Spg11*<sup>-/-</sup> mice from the age of eight months (Fig. Sup 2C). These data suggest that autophagic substrates accumulate in lysosomal structures in the cerebral and cerebellar cortex and in spinal motor neurons in *Spg11*<sup>-/-</sup> mice, but only at late stages of the disease. We further investigated changes in autophagy by carrying out

Western blotting to determine the levels of LC3-II, the lipidated form of LC3 recruited to autophagosomes. LC3-II levels were similar in control and knockout mice, at all ages (Fig. 7C). Thus, spatacsin loss led to the accumulation of the p62 autophagic marker, but this accumulation seems to be only a late event in the disease process.

We analyzed cortical and spinal neurons by electron microscopy to confirm the alteration of lysosomal function in the brain and spinal cord of *Spg11*<sup>-/-</sup> mice (Fig. 8). Lysosomes appeared as electron-dense organelles surrounded by a membrane. We observed in the cortical neurons of two-month old knockout animals lysosomes containing osmiophilic material, suggesting the presence of undigested material (Fig. 8A). These lysosomes also contained low-density structures that are consistent with lipid droplets (Fig. 8A). The size of these lipofuscin-like particles strongly increased with age, as did the size of lysosomes containing autofluorescent material (Fig. 8A). We also observed similar lysosomes in spinal motor neurons, Purkinje cells and hippocampal neurons of *Spg11*<sup>-/-</sup> mice from the age of two months (Fig. 8B and data not shown). These structures were positive for cathepsin D, suggesting a lysosomal origin (Fig. 8C). Similar structures have been observed in a large number of cortical neurons in the brain of an SPG11 patient (Denora et al., 2016) carrying two truncating heterozygous mutations in *trans* (Fig. 8D), suggesting that they contribute to the neuropathological process. The significant increase in lipid-containing structures in *Spg11*<sup>-/-</sup> neurons, even in young animals, suggests that lipid clearance by lysosomes may be impaired.

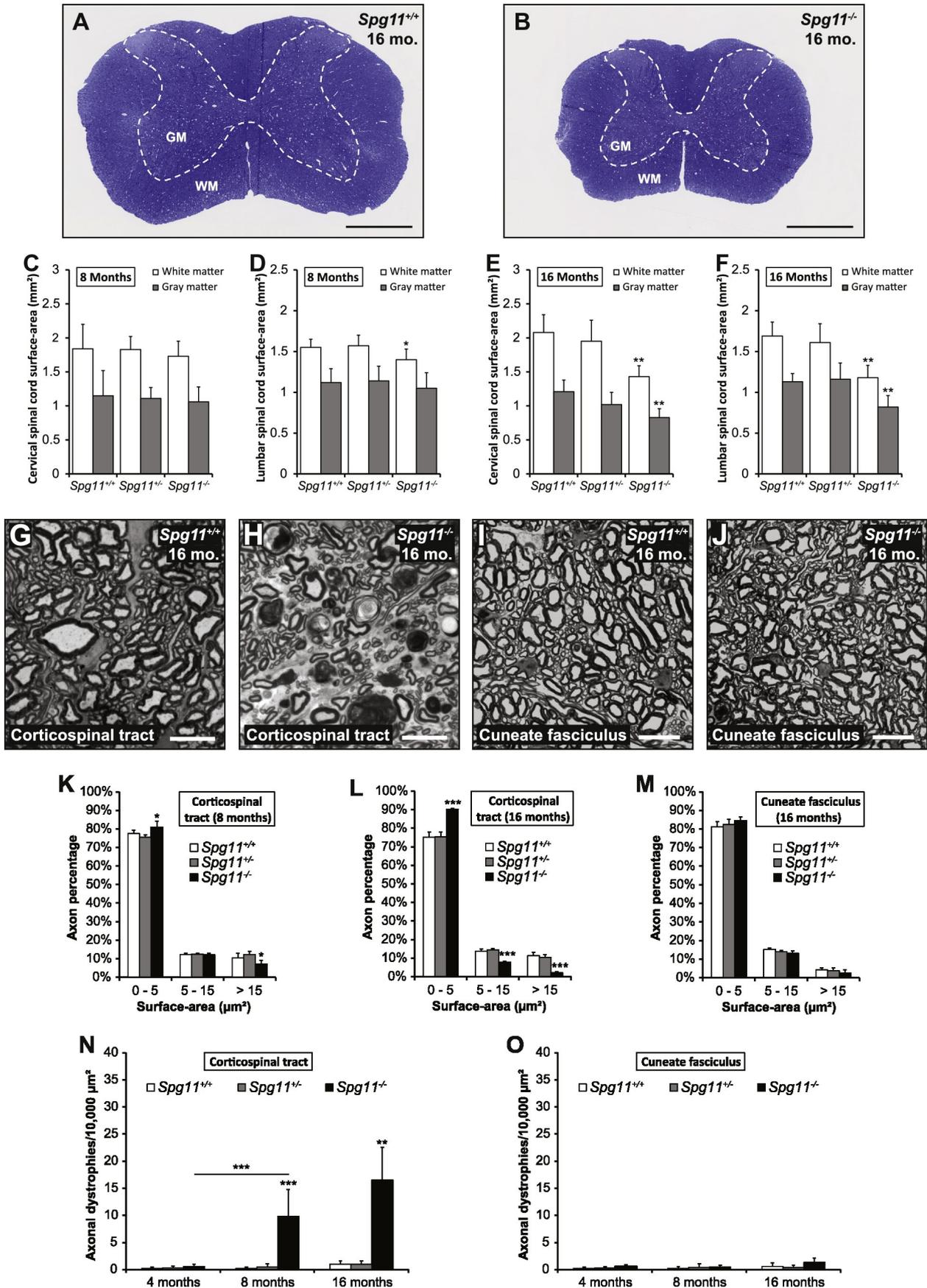
## 2.7. Spatacsin promotes the clearance of lipids from lysosomes

We investigated the cellular alterations underlying lysosomal dysfunction in the brains of *Spg11*<sup>-/-</sup> mice by studying primary cultures of mouse embryonic fibroblasts and cortical neurons by electron microscopy. The proportion of lysosomes containing osmiophilic material was significantly higher in *Spg11*<sup>-/-</sup> fibroblasts (Fig. 9A and B) and neurons (Fig. 10A and B), as observed in the brains of *Spg11* knockout mice and human SPG11 patients. We tested whether lysosomes accumulated lipidic material, by labeling lysosomes in fibroblasts and neurons with the Lamp1 antibody and total lipids with Nile red, which stains all neutral and polar lipids (Greenspan et al., 1985). The proportion of Nile red staining colocalized with lysosomes was higher in *Spg11*<sup>-/-</sup> fibroblasts (Fig. 9C and D) and cortical neurons (Fig. 10C and D) than control cells, confirming the accumulation of lipids in lysosomes in both these cell types under basal conditions.

Material may accumulate in lysosomes due to changes in lysosomal pH or the inhibition of lysosomal proteolytic activity. The lysosomal pH was 4.59 ± 0.19 in control fibroblasts and 4.53 ± 0.21 in *Spg11*<sup>-/-</sup> fibroblasts (n = 500 cells per replicate, 5 independent experiments performed in quadruplicate) as measured using the Lysosensor Green probe. Cathepsin B activity, monitored with the Magic Red Cathepsin B substrate, was not affected by the absence of spatacsin (data not shown). These data suggests that the accumulation of lipids in lysosomes of *Spg11*<sup>-/-</sup> fibroblasts or neurons was not due to changes in lysosomal pH or cathepsin B activity.

We hypothesized that spatacsin could play a role in the clearance of lipids from lysosomes. It has been suggested that autophagy shuttles phospholipids of organelle membranes into lysosomes, and that fatty

**Fig. 4.** Loss of spatacsin causes cerebellar and hippocampal impairment. (A) Sagittal view of mouse brain showing the location of the coronal cut sections between Bregma -6.00 and -6.30 mm. (B) The surface-area of the cerebellum was lower in the knockout than in the control mice from eight months. (n ≥ 5 slices/animal and n ≥ 5 animals/genotype/age; Kruskal-Wallis test; \*p ≤ 0.05). (C) The number of Purkinje cells was lower from eight months of age in knockout mice (n ≥ 5 slices/animal and n ≥ 5 animals/genotype/age; Kruskal-Wallis test; \*\*\*p ≤ 0.001). (D and E) Cerebellar sections immunostained for GFAP (green; astrocyte marker), Calbindin (magenta, Purkinje cell marker), and Hoechst-33258 (blue, nucleus marker) revealed a severe loss of Purkinje cells in knockout mice (E) compared to control mice (D). Scale bars: 100 μm. PCL: Purkinje Cell Layer. (F) Sagittal view of mouse brain showing the location of the coronal cut sections between Bregma -1.70 and -2.00 mm. (G–H) NeuN (magenta; neuronal marker) and GFAP (green; astrocyte marker) immunostaining in the hippocampus of *Spg11*<sup>+/+</sup> (G) and *Spg11*<sup>-/-</sup> (H) mice at 16 months of age. Scale bars: 0.5 mm. CA1: *cornu Ammonis* 1 region, CA2: *cornu Ammonis* 2 region, CA3: *cornu Ammonis* 3 region, DG: Dentate Gyrus region. (I) Hippocampal surface-area. The surface-area of the hippocampus was smaller in knockout than control mice at all ages (n ≥ 5 slices/animal and n ≥ 5 animals/genotype/age; Kruskal-Wallis test; \*p ≤ 0.05). (J–L) CA1 (J), CA2 + CA3 (K), and dentate gyrus (L) granule layer surface-areas. The surface-area of CA1 and the dentate gyrus granule layer were affected by atrophy from four months of age in knockout mice compared to control mice (n ≥ 5 slices/animal and n ≥ 5 animals/genotype/age; Kruskal-Wallis test; \*p ≤ 0.05).



acids hydrolyzed by the lysosomes then accumulate in lipid droplets (Rambold et al., 2015). We investigated whether autophagy induction affected the accumulation of lipids in lysosomes by monitoring Nile red and Lamp1 staining. We observed an accumulation of lipids in lysosomes two and six hours after amino-acid deprivation, followed by lipid clearance from lysosomes and the accumulation of lipid droplets (Fig. 9C and D). Inhibition of lysosomal enzymes by pH neutralization with bafilomycin A1 blocked lipid clearance from the lysosomes, confirming that lipid clearance from lysosomes occurred actively (data not shown). Lipids were cleared significantly more slowly from the lysosomes of *Spg11*<sup>-/-</sup> fibroblasts than control cells, suggesting a role for spatacsin in lysosomal lipid clearance (Fig. 9D). Consistent with these findings, the number of lipid droplets was smaller in *Spg11*<sup>-/-</sup> than control cells after 24 h of amino-acid starvation (Fig. 9E). In untreated cells, the number of lipid droplets was also smaller in *Spg11*<sup>-/-</sup> fibroblasts or primary cortical neurons than in control cells (Figs. 9E and 10E), also suggesting a role for spatacsin in the clearance of lipids from lysosomes under basal conditions.

### 3. Discussion

Loss of function mutations in *SPG11* cause a large variety of phenotypes ranging from pure to complex forms of motor neuron diseases, including pure forms of HSP, juvenile-onset ALS or CMT and complex forms of HSP associated with mental impairment or cognitive decline, neuropathy and abnormal MRI features (Montecchiani et al., 2016; Orlacchio et al., 2010; Stevanin et al., 2008). The most striking and common clinical hallmark observed in SPG11 patients is gait disturbance with motor difficulties generally developing in the two first decades of life. Most patients display progressive spasticity of the lower limbs associated with severe muscular weakness. In the *Spg11*<sup>-/-</sup> mouse model generated in this study, behavioral tests revealed progressive gait impairment and motor dysfunction, beginning at the age of six weeks, consistent with the first symptoms detected in human patients before the age of 10 years. This phenotype was associated with progressive neurodegeneration in the motor cortex and cerebellum, as well as the presence of dystrophic axons in the corticospinal tract. SPG11 patients also frequently present peripheral neuropathy associated with distal muscle wasting, in particular when diagnosed with juvenile-onset ALS or CMT. In agreement, the *Spg11*<sup>-/-</sup> mouse model described here also presented a progressive loss of large motor neurons in the gray matter of the lumbar spinal cord and a high proportion of fragmented neuromuscular junctions. This degeneration together with the loss of muscular strength in 12-month old *Spg11*<sup>-/-</sup> mice is consistent with a late ALS-like phenotype in the *Spg11* mouse model. However, the homogenous decrease in the cross section of myofibers in *Spg11*<sup>-/-</sup> mice suggests that muscular atrophy was not a consequence of denervation of individual fibers. Spatacsin may thus play a more general role in muscle physiology, and the loss of function of this protein could directly result in muscular atrophy. Our observation in the *Spg11*<sup>-/-</sup> mouse model is also consistent with the mental impairment observed in most SPG11 patients and the worsening cognitive decline as the disease progresses (Siri et al., 2010; Stevanin et al., 2008; Stevanin et al., 2006). The cognitive

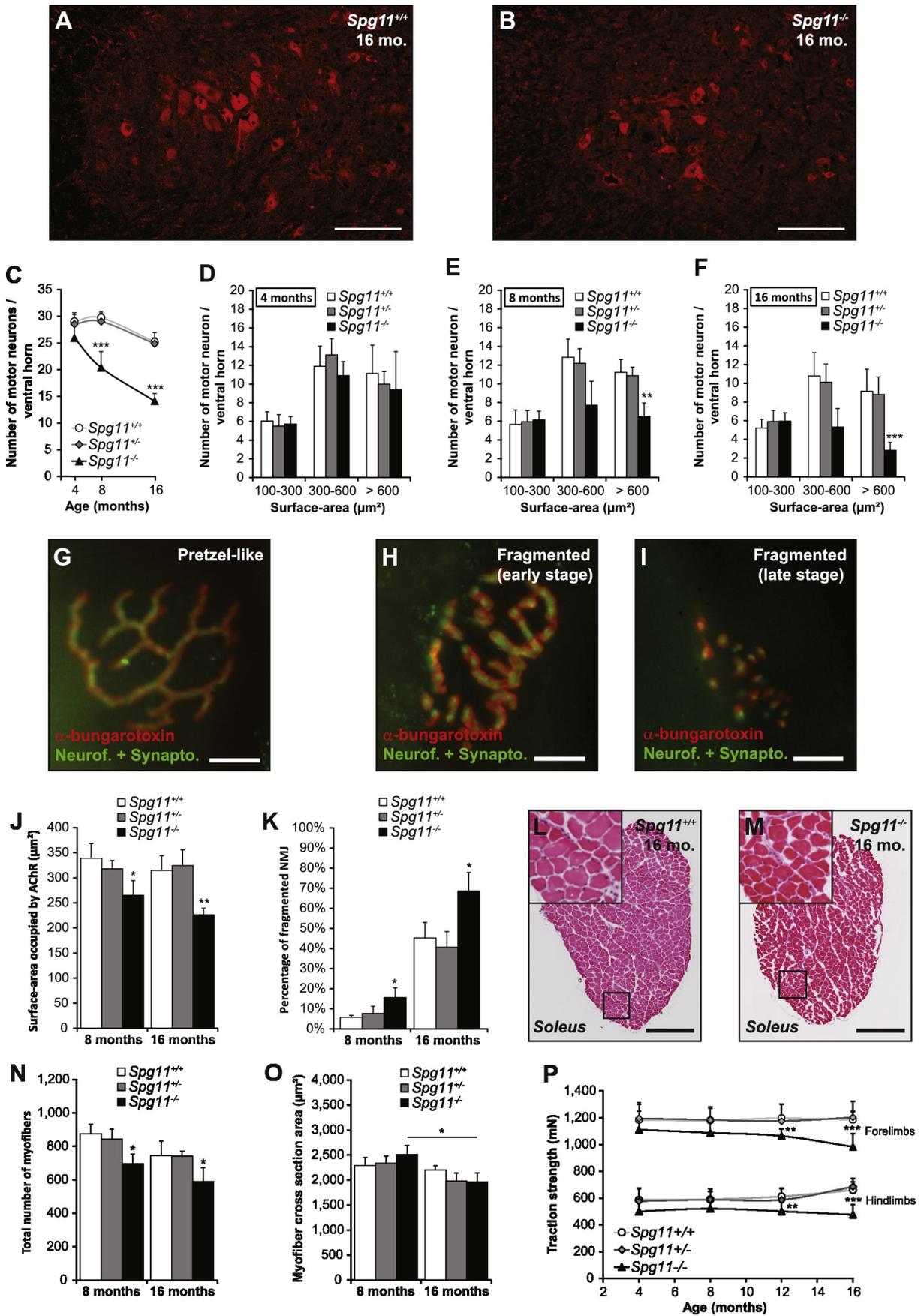
impairment in the mouse was associated with the early atrophy of the hippocampus.

The *Spg11* mouse model we characterized develops motor deficits much earlier than the *Spg11*-knockout mouse developed by Varga et al. (2015). We also observed degeneration of lower motor neurons and thinning of the *corpus callosum* that were absent in the model of Varga et al. (2015), as well as cognitive impairment that was not reported. The discrepancies between the two models may be due to the strategy used to inactivate *Spg11*. Varga et al. inactivated *Spg11* by inserting a genetrapp cassette in the first intron of the gene, whereas we inserted stop codons in exon 32 to mimic the most frequent mutation observed in SPG11 patients (Hehr et al., 2007; Stevanin et al., 2008). The effects of these two types of mutations on some spatacsin isoforms may account for the differences in the results obtained by these two studies. The construct used by Varga et al. (2015) was predicted to encode a cytoplasmic fusion protein of the 82 N-terminal amino acids of spatacsin with  $\beta$ geo (Varga et al., 2015). We could not verify whether the insertion of stop codons in exon 32 led to the production of a truncated protein or complete degradation of the mutant protein, because the antibody we used recognizes the C-terminal domain of spatacsin. The difference between the two studies reflects the remarkable range of phenotypes observed in humans. Indeed, no genotype-phenotype correlation has been shown in SPG11 patients. The same mutations can lead to different phenotypes in the same family (Daoud et al., 2012) and mutations in different parts of the *SPG11* gene lead to the same pathology (Stevanin et al., 2008; Stevanin et al., 2007). Other factors, such as environmental, genomic, or epigenetic factors, may contribute to the variability of phenotypes found in SPG11 patients, and could contribute to the difference in the phenotype observed between our *Spg11* mouse model and that developed by Varga et al. (2015).

Histological and electron microscopy analyses showed the presence of cellular dysfunction in young animals, before neuronal death occurred. In the neurons of *Spg11*<sup>-/-</sup> animals, we observed autofluorescent particles that were surrounded by the lysosomal marker Lamp1 and organelles that contained lipidic material by electron microscopy. The size of both markers increased with age, suggesting that they are the same structure. There was no significant difference in the levels of the autophagy marker LC3-II in brains of the *Spg11*<sup>-/-</sup> mice relative to controls. It is however possible that mild changes in the autophagy pathway occur during disease progression, explaining the large accumulation of lipids and p62 in lysosomes in 16-month-old *Spg11*<sup>-/-</sup> mice, as well as in the brains of SPG11 patients (Denora et al., 2016).

Our data show that lipids accumulate in lysosomes very early in development. Indeed, they were already detected in cultured *Spg11*<sup>-/-</sup> fibroblasts and neurons obtained from embryos. This may contribute in the long term to the generation of lipofuscin that has been proposed to be composed of numerous lipid species (Sulzer et al., 2008). How the loss of spatacsin function leads to the accumulation of lipids in lysosomes remains to be determined. The absence of spatacsin did not alter lysosomal pH nor impair cathepsin B catalytic activity. Artificial activation of autophagy in mouse embryonic fibroblasts resulted in the transient accumulation of lipids in lysosomes and the formation of lipid

**Fig. 5.** *Spg11*<sup>-/-</sup> mice show spinal cord atrophy and axonal degeneration of the corticospinal tract. (A and B) Toluidine blue-stained transverse slices of *Spg11*<sup>+/+</sup> (A) and *Spg11*<sup>-/-</sup> (B) mouse cervical spinal cord at 16 months of age. Scale bars: 0.5 mm. GM: gray matter, WM: white matter. (C–F) Surface-areas of the white and gray matter of the cervical (C and E) and lumbar (D and F) spinal cord at eight and 16 months of age. At eight months, the white matter surface-area of the lumbar spinal cord was lower in *Spg11*<sup>-/-</sup> mice than controls and at 16 months of age, the whole spinal cord of knockout mice was atrophied ( $n \geq 5$  slices/animal and  $n \geq 5$  animals/genotype/age; Kruskal-Wallis test; \* $p \leq 0.05$  and \*\* $p \leq 0.01$ ). (G and H) Toluidine blue-stained transverse slices of *Spg11*<sup>+/+</sup> (G) and *Spg11*<sup>-/-</sup> (H) mouse corticospinal tract at 16 months of age. Scale bars: 10  $\mu$ m. (I and J) Toluidine blue-stained transverse slices of *Spg11*<sup>+/+</sup> (I) and *Spg11*<sup>-/-</sup> (J) mouse cuneate fasciculus at 16 months of age. Scale bars: 10  $\mu$ m. (K and L) Distribution of corticospinal tract axons according to their section surface-area at eight (K) and 16 (L) months of age. Knockout mice displayed a lower percentage of large surface-area axons than control mice from eight months of age ( $n \geq 5$  slices/animal and  $n \geq 10$  animals/genotype/age; Kruskal-Wallis test; \* $p \leq 0.05$  and \*\*\* $p \leq 0.001$ ). (M) Distribution of cuneate fasciculus axons according to their section surface-area at 16 months of age ( $n \geq 5$  slices/animal and  $n \geq 10$  animals/genotype/age; Kruskal-Wallis test). (N) Number of dystrophic axons in a 10,000  $\mu$ m<sup>2</sup> area of the corticospinal tract at 4, 8, and 16 months of age ( $n \geq 5$  slices/animal and  $n \geq 10$  animals/genotype/age; Kruskal-Wallis test; \*\* $p \leq 0.01$  and \*\*\* $p \leq 0.001$ ). (O) Number of dystrophic axons in a 10,000  $\mu$ m<sup>2</sup> area of the cuneate fasciculus at 4, 8, and 16 months of age ( $n \geq 5$  slices/animal and  $n \geq 10$  animals/genotype/age; Kruskal-Wallis test).



droplets, as observed in other models (Rambold et al., 2015). The clearance of lipids from lysosomes was lower in absence of spatacsin, which may account for the slight accumulation of lipids in lysosomes and the smaller number of lipid droplets at steady state. We were unable to promote lipid accumulation in lysosomes upon starvation in cultured neurons, because they do not respond to this stimulus (data not shown), as previously reported (Mizushima et al., 2004). Nevertheless, the change in lipid metabolism was evident under basal conditions, suggesting that the loss of spatacsin function impaired lipid clearance from lysosomes in neurons as well.

The mechanism for spatacsin-mediated clearance of lipids from lysosomes remains enigmatic, especially as the precise subcellular localization of spatacsin is still debated (Chang et al., 2014; Khundadze et al., 2013; Sagona et al., 2010; Slabicki et al., 2010; Vantaggiato et al., 2013). We hypothesize that spatacsin acts as a lipid transporter as it has been proposed to have transmembrane regions (Stevanin et al., 2007) and has been found to be localized in lysosomes (Hirst et al., 2013). Alternatively, the proposed role of spatacsin in autolysosome reformation (Chang et al., 2014) could play a role in sorting lipids within lysosomes. However, it was not possible to evaluate whether these tubular lysosomal structures contained lipids, detected by Nile Red staining, because of their small diameter. The absence of spatacsin function may also deregulate lysosomal protein machinery implicated in lipid egress, which remains to be identified, possibly through a disturbance in membrane-trafficking, which is altered in SPG11 cells (Perez-Branguli et al., 2014).

Regardless of the molecular mechanism involved, the loss of spatacsin function resulted in the presence of fewer lipid droplets. Changes in lipid droplet metabolism have been reported for other proteins associated with the physiopathology of HSP, such as spastin, atlastin1, REEP1 and spartin (Falk et al., 2014; Klemm et al., 2013; Papadopoulou et al., 2015; Renvoise et al., 2016; Renvoise et al., 2012). It would be informative to investigate whether the changes in lipid droplet number or size reflect changes in lysosome-mediated lipid trafficking in these models, as in the *Spg11*<sup>-/-</sup> mouse model. Proteins linked to the biogenesis of lipid droplets were identified as neurotoxicity modifiers associated with VAPB, a gene mutated in ALS8 (Sanhueza et al., 2015). It would be worthwhile to investigate whether lysosomal function and lipid droplet metabolism are also altered in various ALS mouse models to better understand the overlap between SPG11/ALS5 and typical ALS pathology.

In conclusion, the *Spg11*<sup>-/-</sup> mouse model presented here recapitulates the full set of symptoms observed in human HSP, CMT and juvenile-onset ALS and is therefore a good model to investigate the mechanisms underlying their physiopathology. Examination of the cellular alterations observed in this model suggests that the loss of spatacsin function alters lipid metabolism in lysosomes. Our study therefore links two of the main themes, lysosome dysfunction and lipid metabolism, that are recurrent in the function of proteins encoded by the numerous genes associated with HSP and opens common avenues of research for future therapy linked to lipid turnover.

## 4. Methods

### 4.1. Generation and breeding of *Spg11* knockout mice

*Spg11*-knockout mice were generated as previously described (Schnutgen et al., 2003). The gene targeting vector was constructed by inserting a fragment corresponding to mouse exon 32 to exon 34 (sv129 genetic background) into intron 34 in an inverse orientation, with c.6052C>T and c.6061C>T substitutions in exon 32 (Fig. 1A). MCI-1295v/Pas ES cell lines were transfected with the resulting construct and screened by Southern blotting and PCR. Homologous recombinant clones were injected into blastocysts. Chimeric mice were mated with C57BL/6 females to obtain germline transmission. The Neo selection cassette was removed by crossing with a *flp*-expressing mouse. The ubiquitous insertion of exon 32-bearing stop mutations was achieved by crossing the mice with a line expressing Cre recombinase under the control of the CMV promoter. Heterozygous mice were then backcrossed with C57BL/6N mice for 10 generations.

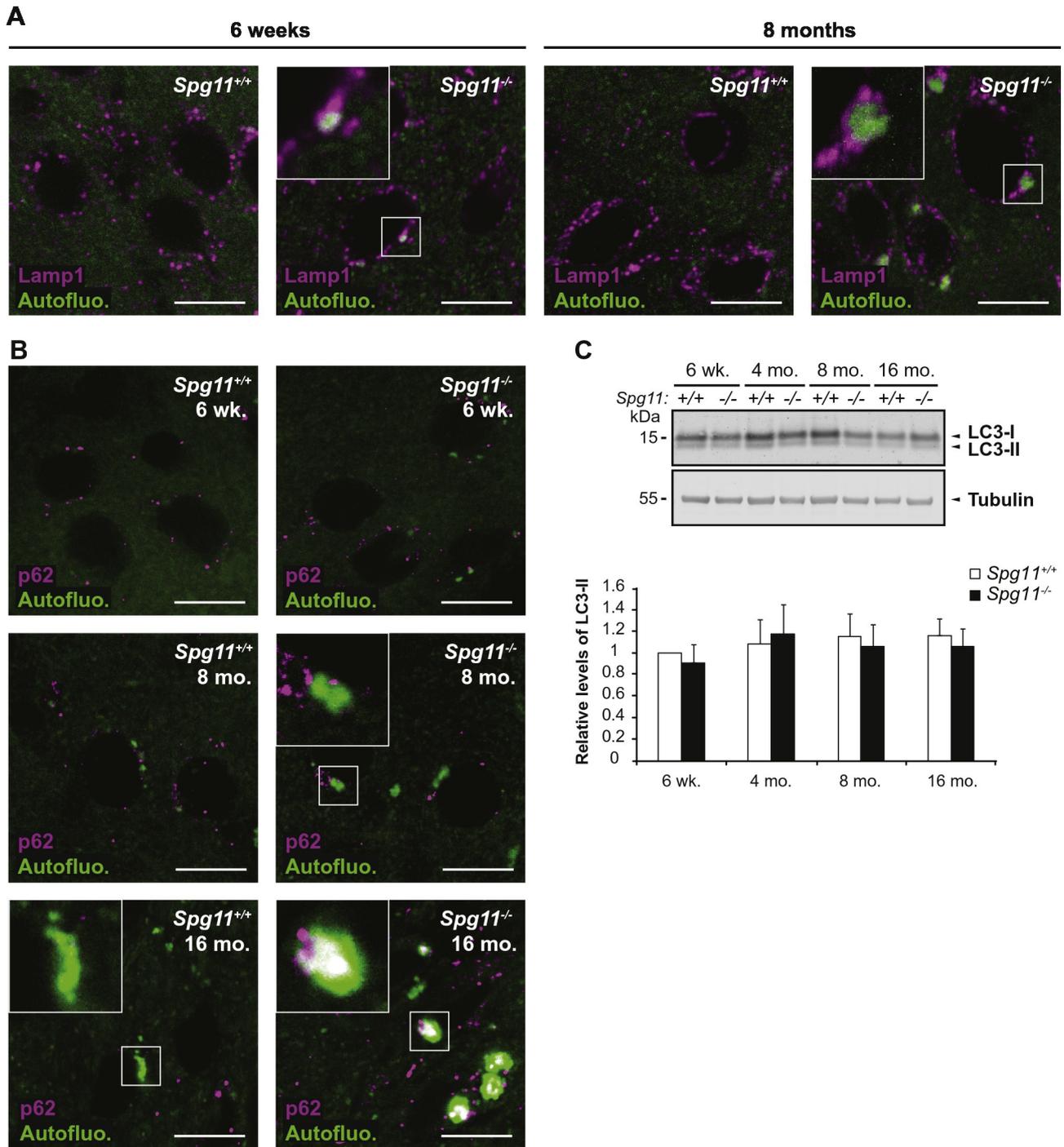
Genotyping was performed by PCR with the 5'GCCAAGGTATGCACCA GACGGGG3' and 5'TCCTGCCCTTACCACGTCAGG3' primers. PCR products of 493 and 434 bp were obtained for the invalidated and wild-type alleles, respectively. Mice were housed in same-sex groups and maintained on a 12-h light/12-h dark cycle with unrestricted access to food and water.

### 4.2. Behavioral evaluation

At least 10 animals per genotype and per age were tested. All behavioral procedures were performed between 8:00 a.m. and 1:00 p.m. Bias was minimized by randomly testing mice in experimental cohorts, regardless of their genotype. The treadmill test was performed with an apparatus consisting of a plastic chamber containing a 4 × 16 cm treadmill (CleverSys). The mice were tested individually at a controlled speed of 10 cm · s<sup>-1</sup>. After a 1-min habituation phase, the gait of the mice was recorded for 20 s (80 frames per s, BCam). Gait was analyzed using GaitScan software (CleverSys). The motor deficit was also evaluated with a Rotarod apparatus (accelerating model LE8200, Bioseb). Mice were placed on the accelerating rod at a starting speed of 4 rpm. The final speed of 40 rpm was reached within 5 min. Mice were tested on two consecutive days, in five trials per day, with an interval of 15 min between trials. The duration for which they were able to remain on the rod was recorded.

Cognitive function was monitored using the Y-maze and fear conditioning tests. The Y-maze consists of three transparent arms of equal length separated by the same distance (40 cm long, 20 cm high, 10 cm wide, 120°). Visual cues are placed in the room. One arm of the maze (arm B) was blocked by a removable opaque partition and the mice were placed individually in the starting arm (arm A) of the apparatus facing the center of the maze. The mouse was allowed to walk freely into the maze. When it arrived at the end of the open arm (arm C), the partition was put in place retaining the mouse. After 1 min, the mouse was immediately placed in the starting arm again (arm A), and

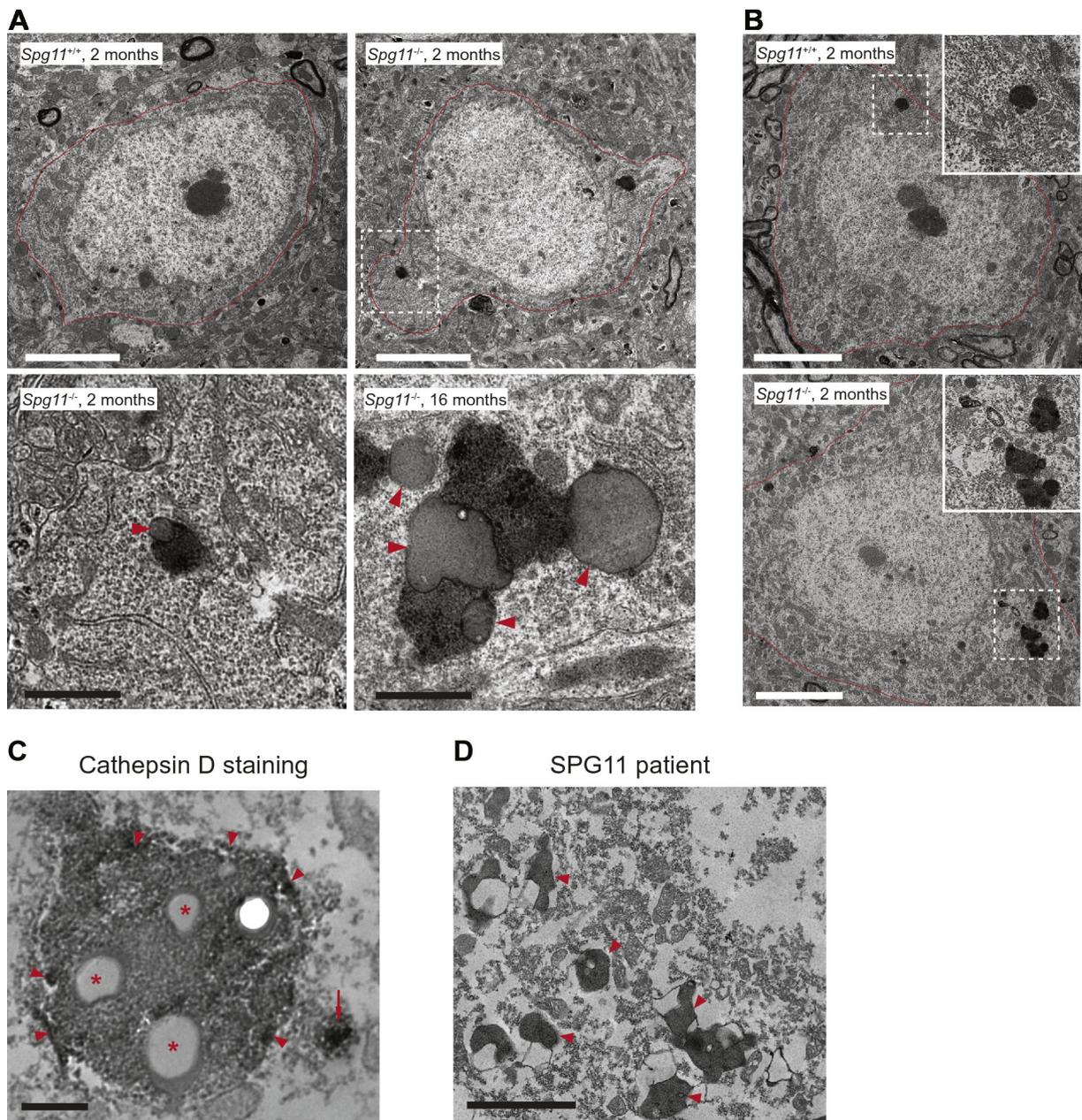
**Fig. 6.** Loss of spatacsin leads to spinal motor neuron degeneration and amyotrophy. (A and B) ChAT (red; spinal motor neuron marker) immunostaining of lumbar spinal cord slices of *Spg11*<sup>+/+</sup> (A) and *Spg11*<sup>-/-</sup> (B) mice at 16 months of age. Scale bars: 50 μm. (C–F) Quantitative analysis of the total number (C) and cell body area (D–F) of motor neurons per ventral horn in the lumbar spinal cord of *Spg11*<sup>+/+</sup>, *Spg11*<sup>+/-</sup> and *Spg11*<sup>-/-</sup> mice at 4, 8, and 16 months of age. Knockout mice displayed fewer large spinal motor neurons than controls from eight months. (n ≥ 5 slices/animal and n ≥ 10 animals/genotype/age; Kruskal-Wallis test; \*\*\*p ≤ 0.01 and \*\*\*\*p ≤ 0.001). (G–I) Neuromuscular junction labeling with α-bungarotoxin (Red, postsynaptic marker) and anti-neufilament plus anti-synaptophysin antibodies (green, presynaptic markers), representing a normal Pretzel-like plaque (G) and abnormal fragmented plaques (H and I). Scale bars: 10 μm. (J) Neuromuscular junction (NMJ) surface-area in the soleus of *Spg11*<sup>+/+</sup>, *Spg11*<sup>+/-</sup>, and *Spg11*<sup>-/-</sup> mice at eight and 16 months of age. (n ≥ 200 NMJ/animal and n ≥ 5 animals/genotype/age; Kruskal-Wallis test; \*p ≤ 0.05; \*\*p ≤ 0.01). The NMJ surface-area of *Spg11*<sup>-/-</sup> mice was significantly less than in control mice. (K) Percentage of fragmented NMJ in the soleus of *Spg11*<sup>+/+</sup>, *Spg11*<sup>+/-</sup>, and *Spg11*<sup>-/-</sup> at 8 and 16 months of age. (n ≥ 200 NMJ/animal and n ≥ 5 animals/genotype/age; Kruskal-Wallis test; \*p ≤ 0.05). *Spg11*<sup>-/-</sup> mice exhibited a higher percentage of fragmented neuromuscular junctions than control mice. (L and M) Hematein/Eosin-stained transverse slices of the medial part of the *Spg11*<sup>+/+</sup> (L) and *Spg11*<sup>-/-</sup> (M) soleus at 16 months of age. Scale bars: 400 μm. (N and O) Total number (N) and cross-section area (O) of soleus myofibers from *Spg11*<sup>+/+</sup>, *Spg11*<sup>+/-</sup>, and *Spg11*<sup>-/-</sup> mice at eight and 16 months of age (n ≥ 3 muscle slices/animal and n ≥ 5 animals/genotype/age; Kruskal-Wallis test; \*p ≤ 0.05). (P) Grip test. *Spg11*<sup>-/-</sup> mice showed a significant loss of muscular strength in both forelimbs and hindlimbs from 12 months of age compared to control mice (n ≥ 12 animals/genotype/age; Kruskal-Wallis test; \*\*p ≤ 0.01 and \*\*\*\*p ≤ 0.001).



**Fig. 7.** Accumulation of autofluorescent particles colocalised with Lamp1 in cortical motor neurons of *Spg11*<sup>-/-</sup> mice. (A) Lamp-1 (magenta; lysosome marker) immunostaining and autofluorescent material (green) in *Spg11*<sup>+/+</sup> and *Spg11*<sup>-/-</sup> cortical motor neurons from six-week and eight-month-old animals. Confocal microscopy images show autofluorescent particles surrounded by Lamp-1-positive staining in *Spg11*<sup>-/-</sup> neurons. Scale bars: 10  $\mu$ m. (B) p62 (magenta) immunostaining and autofluorescence (green) in *Spg11*<sup>+/+</sup> and *Spg11*<sup>-/-</sup> cortical motor neurons at six weeks, eight months, and 16 months of age. Confocal microscopy images show autofluorescent particles colocalizing with p62-positive staining only in the cortical motor neurons of 16-month-old *Spg11*<sup>-/-</sup> mice. Scale bars: 10  $\mu$ m. (C) Western blot showing levels of LC3I, LC3-II, and tubulin in extracts from *Spg11*<sup>+/+</sup> and *Spg11*<sup>-/-</sup> mouse cortices taken from animals of different ages. Quantification of LC3-II band intensities normalized against tubulin levels. The graph shows the mean  $\pm$  SEM values.  $n = 3$  independent samples.

the partition was removed to offer two choices. Alternation was defined as spontaneous entry into the unvisited arm (arm B). On the contrary, re-entry into the already explored arm (arm C) was considered to be an error. Contextual fear conditioning was performed in a Plexiglas chamber (17  $\times$  17  $\times$  25 cm) placed in a sound-attenuating box (Fear Conditioning Systems Series 46000, Ugo Basile SRL Comerio Italy). The

walls of the chamber are covered by a removable checkerboard context. The bottom of the chamber is composed of a stainless steel grid floor (rods were 2 mm in diameter and spaced 1 cm apart) connected to a scrambled shock generator. Training was initiated by placing the mice in the training context and the freezing baseline was scored during the first 120 s. Then, two electric shocks (2 s, 0.62 mA spaced by 60 s)



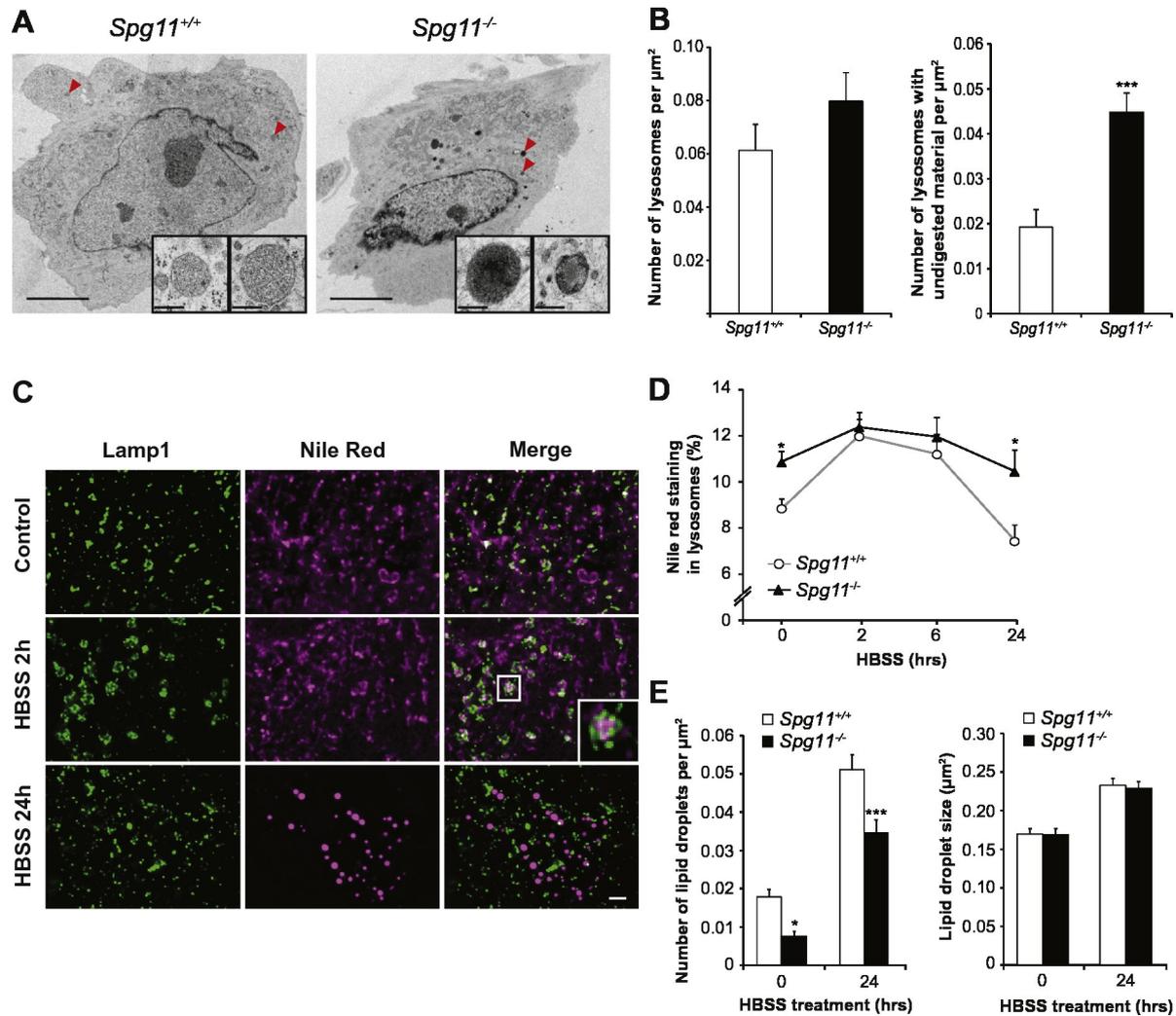
**Fig. 8.** Loss of spatacsin promotes the accumulation of lipids in lipofuscin-like structures in neurons. (A) Electron micrographs of cortical neurons from *Spg11*<sup>+/+</sup> and *Spg11*<sup>-/-</sup> mice at two or 16 months. Red lines indicate the plasma membrane of neurons. Arrowheads indicate low-density structures consistent with lipid droplets. Scale bars: 5 μm (upper panels) and 1 μm (lower panels). (B) Electron micrographs of spinal cord motor neurons from two-month old *Spg11*<sup>+/+</sup> and *Spg11*<sup>-/-</sup> mice. Red lines indicate the plasma membrane of motor neurons. White squares indicate the zone shown at higher magnification in the insets. Scale bars: 5 μm. (C) Cathepsin D immunoelectron microscopy revealed with diaminobenzidine (DAB), showing the presence of DAB precipitates in lipofuscin-like structures (red arrowheads). Note the presence of DAB precipitates in a lysosome (red arrow). Asterisks indicate low-density structures compatible with lipid droplets. Scale bar: 500 nm. (D) Electron microscopy images of cortical neurons in the brain of an SPG11 patient (duration of disease: 10 years; age at death: 32 years), showing the accumulation of lipofuscin (arrowheads). The patient had the typical clinical features of SPG11 and carried, in *trans*, the heterozygous mutations c.2358\_2359delinsTT (p.Glu786\_Gly787delinsAspfs\*) in exon 13 and c.4868delT (p.Leu1623Tyrfs\*17) in exon 28. Post-mortem delay was 48 h, explaining the presence of vacuoles in the tissue. Scale bar: 2 μm.

were delivered under the control of AnyMaze software. The end of the training session consisted of a 120 s period during which freezing was recorded. Contextual fear conditioning was tested 24 h after training by returning mice to the training chamber and scoring freezing for 180 s without electrical shocks.

Muscle strength was recorded with a grip test system (Dual Sensor 1027CD-M, Columbus, Linton Instrumentation). When the animal firmly gripped the triangular metal rod, the experimenter gently pulled its tail horizontally until the animal released its hold. The maximum traction force (mN) developed by the forelimbs and hindlimbs was recorded.

#### 4.3. Antibodies

Antibodies used in the study were: rabbit anti-spatacsin (Protein Tech, directed against aa 2094–2443 of human spatacsin); rabbit anti-spastizin (Murmu et al., 2011); mouse anti-α-tubulin (Abcam); mouse anti-NeuN (Millipore); rabbit anti-GFAP (DAKO); monoclonal mouse anti-Calbindin, 1:300, (Swant); goat anti-Choline acetyltransferase (ChAT), 1:500, (Millipore); rabbit anti-Neurofilament-L, 1:100, (Millipore); mouse Alexa Fluor® 488 conjugated anti-Synaptophysin, 1:25, (Millipore); rat anti-Lamp1 (Clone 1D4B), mouse anti-p62 (Abcam); rabbit anti-LC3 (Novus Biologicals); goat anti-caspase-3



**Fig. 9.** Spatacsin loss prevents the egress of lipids from lysosomes in mouse embryonic fibroblasts. (A). Electron micrographs of fibroblasts obtained from *Spg11<sup>+/+</sup>* or *Spg11<sup>-/-</sup>* embryos. The inset shows a higher magnification of the lysosomes indicated by the arrowheads. Note the presence of osmiophilic, undigested material in the lysosomes of *Spg11<sup>-/-</sup>* cells. (B). Quantification of lysosome density and the mean number of lysosomes containing undigested material per  $\mu\text{m}^2$ . The graph shows the means  $\pm$  SEM.  $n > 20$  cells in two independent experiments. *t*-test; \*\*\* $p \leq 0.001$ . (C). Lamp1 Immunostaining (green) and Nile red staining (magenta) of primary cultures of mouse embryonic fibroblasts cultured for 0, 2, or 24 h in an amino acid-poor medium (HBSS). After 24 h in HBSS, the Nile red staining was concentrated in lipid droplets. Scale bar: 2  $\mu\text{m}$ . (D). Quantification of the colocalization of Nile red staining with the lysosomal marker Lamp1 in cells cultured for 0, 2, or 24 h in an amino acid-poor medium (HBSS). The graph shows the means  $\pm$  SEM.  $n > 50$  cells in five independent experiments. Two-way ANOVA followed by the Holm-Sidak test; \* $p \leq 0.05$ . (E). Quantification of the number and size of lipid droplets. Graphs show the means  $\pm$  SEM ( $n > 50$  cells in five independent experiments). Two-way ANOVA followed by the Holm-Sidak test; \* $p \leq 0.05$ ; \*\*\* $p \leq 0.001$ .

(Millipore). For immunoblotting, the secondary antibodies were conjugated to horseradish peroxidase (Jackson Laboratories) or fluorochromes (IR-dye 800 or IR-dye 680; LI-COR). Secondary antibodies used for immunofluorescence were purchased from Life Technologies.

#### 4.4. Histological and immunohistochemical analyses

Mice were anesthetized by the intraperitoneal injection of 1/6 2% xylazine (Rompun), 1/3 ketamine (10  $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ , Imalgen 1000) in phosphate-buffered saline (PBS) and were subjected to intracardiac perfusion of 4% paraformaldehyde in PBS.

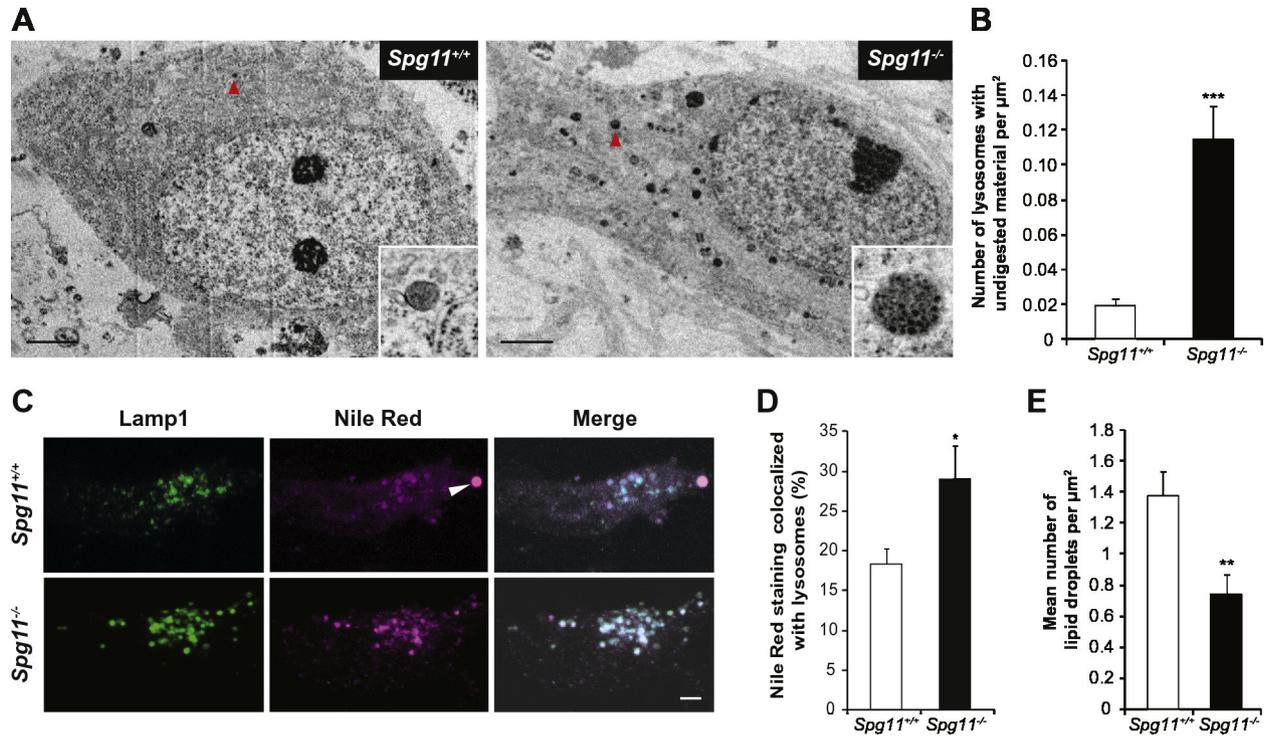
For immunostaining analysis, the brains and spinal cords were dissected and post-fixed by incubation for 24 h in 4% paraformaldehyde and 24 h in 30% sucrose PBS. Slices (20  $\mu\text{m}$  for brain and 40  $\mu\text{m}$  for lumbar spinal cord) were cut on a freezing microtome (Microm HM450, Thermo Scientific) and maintained in 0.02% sodium azide in PBS at 4 °C. After 90 min incubation in blocking solution, sections were incubated with primary antibodies in 2% BSA/0.25% Triton X-100 in PBS overnight at 4 °C.

After washing, the sections were incubated with the secondary antibodies for 90 min at room temperature, and mounted in Fluoromount-G mounting medium (Southern Biotechnology). Staining specificity was determined by incubation in the absence of primary antibodies.

Whole-mount preparations of muscle fibers were stained for motor endplates with Alexa Fluor® 555-conjugated  $\alpha$ -bungarotoxin 1:500 (Life technologies) and for presynaptic motor nerve terminals with anti-Neurofilament L and anti-Synaptophysin antibodies in 2% BSA/0.5% Triton X-100 Glycin 0.15% in PBS 48 h at 4 °C. After washing, the sections were incubated with the secondary antibodies for 60 min at room temperature, and mounted in Fluoromount-G mounting medium (Southern Biotechnology).

For morphological analysis, cervical (C1 to C7) and lumbar (L1 to L5) parts of the spinal cords were placed in 2% glutaraldehyde for 24 h. They were then embedded in EPON resin and 1  $\mu\text{m}$ -thin sections were stained with toluidine blue for 1 h.

For muscle typology, *soleus* muscles were frozen into NEG-50™ (Thermo Scientific) at  $-60$  °C. Transversal sections (10  $\mu\text{m}$ ) of the



**Fig. 10.** Spatacsin loss promotes lipid accumulation in lysosomes in primary cultures of cortical neurons. (A). Electron micrographs of primary cultures of cortical neurons derived from *Spg11*<sup>+/+</sup> or *Spg11*<sup>-/-</sup> embryos. The inset shows a higher magnification of the lysosomes indicated by arrowheads. Note the presence of undigested material in the lysosomes of *Spg11*<sup>-/-</sup> neurons. Also, note the large number of lysosomes containing undigested material, appearing in black, in *Spg11*<sup>-/-</sup> neurons. Scale bar: 2  $\mu\text{m}$ . (B). Quantification of the mean number of lysosomes containing undigested material per  $\mu\text{m}^2$ . The graph shows the means  $\pm$  SEM ( $n > 20$  cells). *t*-test; \*\*\* $p \leq 0.001$ . (C). Lamp 1 immunostaining (green) and Nile red staining (magenta) of primary cultures of cortical neurons. The arrowheads indicate lipid droplets appearing as very bright structures upon Nile red staining. (D). Quantification of the colocalization of Nile red staining with the lysosomal marker Lamp1. The graph shows the means  $\pm$  SEM ( $n > 70$  cells in four different experiments). *t*-test; \* $p \leq 0.05$ . (E). Number of lipid droplets per neuron in primary cultures of cortical neurons. The graph shows the means  $\pm$  SEM ( $n > 70$  cells in four independent experiments). *t*-test; \*\* $p \leq 0.005$ .

medial part of the muscle were prepared with a Leica CM3050S cryostat and stained with Hematein for 3 min and Eosin for 1 min.

The surface-areas of the brains or brain regions were determined using NDPview software. Counting of cell populations was performed using ImageJ software. Spinal motor neuron, neuromuscular junction, and corticospinal tract images were collected with a Leica DFC500 camera mounted on a Leica DM4000B microscope with 40 $\times$ , 60 $\times$  and 100 $\times$  objectives. Whole spinal cord and muscle Images were obtained with a NanoZoomer 2.0-RS (Hamamatsu) equipped with a 20 $\times$  objective. Identical brightness, contrast and colour balance adjustments were applied to all groups. Confocal images were acquired with an Olympus FV-1000 confocal laser scanning microscope, with a 60 $\times$  objective. Autofluorescence was triggered by excitation with a 488 nm laser.

#### 4.5. Cell biology

Mouse embryonic fibroblasts and primary cultures of cortical neurons were prepared as previously described (Gautier et al., 2012). Immunostaining was performed after six days of culture *in vitro*, as previously described (Murmu et al., 2011). For lipid staining, cells were incubated for 1 h with Nile Red (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) in PBS, and then washed three times in PBS. Images were acquired on an inverted Zeiss Axiovert 200 M microscope and processed using Huygens deconvolution software. ImageJ was used to quantify the colocalization of Nile Red staining with lysosomes. Lipid droplets were stained either with Bodipy 493/503 (Life Technologies) or Nile Red. Their number and size were analyzed using the spot detector of ICY software.

Cathepsin B catalytic activity and lysosomal pH were quantified on an automated ArrayScan XTI apparatus (Thermo-Fisher) using the General Intensity Measurement protocol, analyzing  $> 500$  cells per well and per set of conditions. Fibroblast detection was facilitated by incubation

with Cell Tracker Deep Red (Life Technologies) in HCSS (0.12 M NaCl, 5.4 mM KCl, 15 mM glucose, 2 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0.7 mM  $\text{MgCl}_2$ , 20 mM HEPES, pH 7.4) for 30 min. Cathepsin B activity was determined with the Magic Red Cathepsin B Assay Kit, according to the manufacturer's instructions (ImmunoChemistry Technologies). Lysosomal pH was determined by incubating the cells with Lysosensor Green (Life Technologies) in HCSS for 1 h. Fluorescence intensity was compared with that of cells incubated in calibration solutions with a pH ranging from 3.5 to 6. For calibration, cells were incubated for 30 min in 145 mM KCl, 10 mM glucose, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , and 20 mM MES supplemented with 5  $\mu\text{M}$  nigericin (Sigma) and 0.25  $\mu\text{M}$  valinomycin (Sigma), with artificial adjustment of the pH. Fluorescence was converted into pH values by curve fitting.

#### 4.6. Electron microscopy

Briefly, mice were anesthetized and sacrificed by intracardiac perfusion with a solution of 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer at pH 7.4. Samples from the frontal cortex and spinal cord were fixed in 1% glutaraldehyde in the same buffer, post-fixed in 2% osmium tetroxide, dehydrated, and embedded in Araldite. Ultrathin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate and examined by a Hitachi transmission electron microscope. To analyze cultured fibroblasts and neurons, cells were fixed with 2.5% glutaraldehyde in PBS for 2 h at 22  $^{\circ}\text{C}$ . The cells were then post-fixed in 1% osmium tetroxide for 20 min, rinsed in distilled  $\text{H}_2\text{O}$ , dehydrated in 50% and 70% ethanol, incubated in 1% uranyl acetate for 30 min, processed in graded dilutions of ethanol (95–100%, 5 min each), and embedded in Epon. Ultrathin (70 nm) sections were cut, stained with uranyl acetate and lead citrate, and analyzed with a JEOL 1200EX II electron microscope at 80 kV.

#### 4.7. Western blot analysis

Cells or tissues were lysed by incubation in 100 mM NaCl, 10 mM Tris HCl pH 7.4, 1 mM EGTA, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1% SDS, and Halt™ Protease Inhibitor Cocktail (Thermo Scientific) for 5 min at room temperature. Western blotting was performed as described previously (Esteves et al., 2014). Signals were visualized with a chemiluminescence substrate (SuperSignal West Dura), or acquired with an Odyssey CIX (Li-COR). Signal intensities were quantified using ImageJ software.

#### 4.8. Statistics

All values are displayed as the means ± SEM within each group. A Kolmogorov–Smirnov normal distribution analysis was first performed on all data. Data sets were compared using the Kruskal–Wallis test for nonparametric data sets and the 2-tailed Student's *t*-test for parametric data sets (Systat version 8.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA). For cellular experiments, two-way ANOVA followed by the Holm Sidak test was used to analyze differences between genotypes at different time points. A *p* value of 0.05 or less was considered to be statistically significant.

#### 4.9. Study approval

The care and treatment of animals followed the N° 2010/63/UE European legislation and national authority (Ministère de l'agriculture, France) guidelines for the detention, use, and ethical treatment of laboratory animals. All the experiments were approved by the local ethics committee (Ce5/2012/045 approval number) and experiments were conducted by authorized personnel. Patient-derived material was obtained through procedures approved by the ethics committee with the written, informed consent of the family (approval SST04/11/04052011).

#### Conflict of interest

The authors have declared that there is no conflict of interest.

#### Author contributions

Conceived and designed the experiments: JB, MB, MDu, AB, KHEH, GS, FD.

Performed the experiments: JB, MB, LS, MDe, CL, AC, MV, TE, RM, MPM, FMS, KHEH, FD.

Analyzed the data: JB, MB, LS, MDe, CL, AC, MV, TE, RM, KHEH, FD.

Wrote the paper: JB, GS, FD.

#### Acknowledgments

We are grateful to the Institut de la Clinique de la souris (ICS)/Phenomin for the generation of the mouse model presented here. We thank the behavior core facility of the ICM and the Plateforme d'Imagerie Cellulaire de la Pitié-Salpêtrière for their contributions. This work benefited from equipment and services from the CELIS cell culture core facility. We also thank Merle Ruberg for critical reading of the manuscript, Agnès Rastetter, Annick Prigent, and Marie Coutelier for their help and Alexandra Durr for discussions. The 1D4B monoclonal antibody developed by August J. Thomas was obtained from the Developmental Studies Hybridoma Bank, created by the NICHD of the NIH and maintained at The University of Iowa, Department of Biology, Iowa City, IA 52242. This study benefited from the program "Investissements d'avenir" ANR-10-IAIHU-06 and ANR-11-INBS-0011-NeurATRIS (Translational Research Infrastructure for Biotherapies in Neurosciences), and was funded by the Verum Foundation [SPATAX to A.B. and G.S.], the French Agency for Research ANR [13-ISV1-00002 to G.S.], the GIS-Maladies Rares Foundation [06/GIS/PB/S/n°71 to G.S.], the Fondation Roger de Spoelberch (to A.B.), the Action Ponctuelle de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes (to K.H.H.), and the European Union with the ANR (to

A.B., Seventh Framework Programme - FP7, Neuromics [FP7-2012-305121]; to G.S., ERARE programme, Neurolipid [ANR-13-ERARE-0003-02]) and the European Research Council [ERC, Starting grant No 311149 to F.D.]. M.B. received a fellowship from the French Ministry of Research (doctoral school ED3C).

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbd.2017.02.007>.

#### References

- Anheim, M., et al., 2009. SPG11 spastic paraplegia. A new cause of juvenile parkinsonism. *J. Neurol.* 256, 104–108.
- Chang, J., et al., 2014. Spastic paraplegia proteins spastizin and spatacsin mediate autophagic lysosome reformation. *J. Clin. Invest.* 124, 5249–5262.
- Daoud, H., et al., 2012. Exome sequencing reveals SPG11 mutations causing juvenile ALS. *Neurobiol. Aging* 33 (839), e5–e9.
- Denora, P.S., et al., 2016. Motor neuron degeneration in spastic paraplegia 11 mimics amyotrophic lateral sclerosis lesions. *Brain*.
- Esteves, T., et al., 2014. Loss of association of REEP2 with membranes leads to hereditary spastic paraplegia. *Am. J. Hum. Genet.* 94, 268–277.
- Falk, J., et al., 2014. Functional mutation analysis provides evidence for a role of REEP1 in lipid droplet biology. *Hum. Mutat.*
- Gautier, C.A., et al., 2012. Regulation of mitochondrial permeability transition pore by PINK1. *Mol. Neurodegener.* 7, 22.
- Greenspan, P., et al., 1985. Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. *J. Cell Biol.* 100, 965–973.
- Hanein, S., et al., 2008. Identification of the SPG15 gene, encoding spastizin, as a frequent cause of complicated autosomal-recessive spastic paraplegia, including Kjellin syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 82, 992–1002.
- Harding, A.E., 1983. Classification of the hereditary ataxias and paraplegias. *Lancet* 1, 1151–1155.
- Hehr, U., et al., 2007. Long-term course and mutational spectrum of spatacsin-linked spastic paraplegia. *Ann. Neurol.* 62, 656–665.
- Hirst, J., et al., 2013. Interaction between AP-5 and the hereditary spastic paraplegia proteins SPG11 and SPG15. *Mol. Biol. Cell* 24, 2558–2569.
- Hughes, R.N., 2004. The value of spontaneous alternation behavior (SAB) as a test of retention in pharmacological investigations of memory. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 28, 497–505.
- Khundadze, M., et al., 2013. A hereditary spastic paraplegia mouse model supports a role of ZFYVE26/SPASTIZIN for the endolysosomal system. *PLoS Genet.* 9, e1003988.
- Klemm, R.W., et al., 2013. A conserved role for atlastin GTPases in regulating lipid droplet size. *Cell Rep.* 3, 1465–1475.
- Menzies, F.M., et al., 2015. Compromised autophagy and neurodegenerative diseases. *Nat. Rev. Neurosci.* 16, 345–357.
- Mizushima, N., et al., 2004. In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Mol. Biol. Cell* 15, 1101–1111.
- Montecchiani, C., et al., 2016. ALS5/SPG11/KIAA1840 mutations cause autosomal recessive axonal Charcot-Marie-Tooth disease. *Brain* 139, 73–85.
- Murmu, R.P., et al., 2011. Cellular distribution and subcellular localization of spatacsin and spastizin, two proteins involved in hereditary spastic paraplegia. *Mol. Cell. Neurosci.* 47, 191–202.
- Orlacchio, A., et al., 2010. SPATACIN mutations cause autosomal recessive juvenile amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 133, 591–598.
- Papadopoulos, C., et al., 2015. Spastin binds to lipid droplets and affects lipid metabolism. *PLoS Genet.* 11, e1005149.
- Perez-Branguli, F., et al., 2014. Dysfunction of spatacsin leads to axonal pathology in SPG11-linked hereditary spastic paraplegia. *Hum. Mol. Genet.* 23, 4859–4874.
- Puech, B., et al., 2011. Kjellin syndrome: long-term neuro-ophthalmologic follow-up and novel mutations in the SPG11 gene. *Ophthalmology* 118, 564–573.
- Rambold, A.S., et al., 2015. Fatty acid trafficking in starved cells: regulation by lipid droplet lipolysis, autophagy, and mitochondrial fusion dynamics. *Dev. Cell* 32, 678–692.
- Renvoise, B., et al., 2012. Spg20<sup>-/-</sup> mice reveal multimodal functions for Troyer syndrome protein spartin in lipid droplet maintenance, cytokinesis and BMP signaling. *Hum. Mol. Genet.* 21, 3604–3618.
- Renvoise, B., et al., 2014. Lysosomal abnormalities in hereditary spastic paraplegia types SPG15 and SPG11. *Ann. Clin. Transl. Neurol.* 1, 379–389.
- Renvoise, B., et al., 2016. Reep1 null mice reveal a converging role for hereditary spastic paraplegia proteins in lipid droplet regulation. *Hum. Mol. Genet.*
- Sagona, A.P., et al., 2010. Ptdlns(3)P controls cytokinesis through KIF13A-mediated recruitment of FYVE-CENT to the midbody. *Nat. Cell Biol.* 12, 362–371.
- Sanhueza, M., et al., 2015. Network analyses reveal novel aspects of ALS pathogenesis. *PLoS Genet.* 11, e1005107.
- Schnutgen, F., et al., 2003. A directional strategy for monitoring Cre-mediated recombination at the cellular level in the mouse. *Nat. Biotechnol.* 21, 562–565.
- Siri, L., et al., 2010. Cognitive profile in spastic paraplegia with thin corpus callosum and mutations in SPG11. *Neuropediatrics* 41, 35–38.
- Slabicki, M., et al., 2010. A genome-scale DNA repair RNAi screen identifies SPG48 as a novel gene associated with hereditary spastic paraplegia. *PLoS Biol.* 8, e1000408.

- Stevanin, G., et al., 2006. Spastic paraplegia with thin corpus callosum: description of 20 new families, refinement of the SPG11 locus, candidate gene analysis and evidence of genetic heterogeneity. *Neurogenetics* 7, 149–156.
- Stevanin, G., et al., 2007. Mutations in SPG11, encoding spatacsin, are a major cause of spastic paraplegia with thin corpus callosum. *Nat. Genet.* 39, 366–372.
- Stevanin, G., et al., 2008. Mutations in SPG11 are frequent in autosomal recessive spastic paraplegia with thin corpus callosum, cognitive decline and lower motor neuron degeneration. *Brain* 131, 772–784.
- Sulzer, D., et al., 2008. Neuronal pigmented autophagic vacuoles: lipofuscin, neuromelanin, and ceroid as macroautophagic responses during aging and disease. *J. Neurochem.* 106, 24–36.
- Vantaggiato, C., et al., 2013. Defective autophagy in spastizin mutated patients with hereditary spastic paraparesis type 15. *Brain* 136, 3119–3139.
- Varga, R.E., et al., 2015. In vivo evidence for lysosome depletion and impaired autophagic clearance in hereditary spastic paraplegia type SPG11. *PLoS Genet.* 11, e1005454.

## Supplementary Figure legends

### Supplementary Figure 1. Accumulation of autofluorescent particles colocalizing with Lamp1 in the cortical motor neurons of *Spg11*<sup>-/-</sup> mice.

(A) Autofluorescent material (green, excitation 488 nm, emission 515-530 nm) in *Spg11*<sup>+/+</sup> and *Spg11*<sup>-/-</sup> cortical motor neurons at six weeks and 4, 8, and 16 months of age. Knockout mice had autofluorescent deposits in their cortical motor neurons from the age of six weeks on. At 16 months of age, this autofluorescent material was also present in control mice, but in smaller amounts than in knockout mice. Scale bars: 10  $\mu$ m.

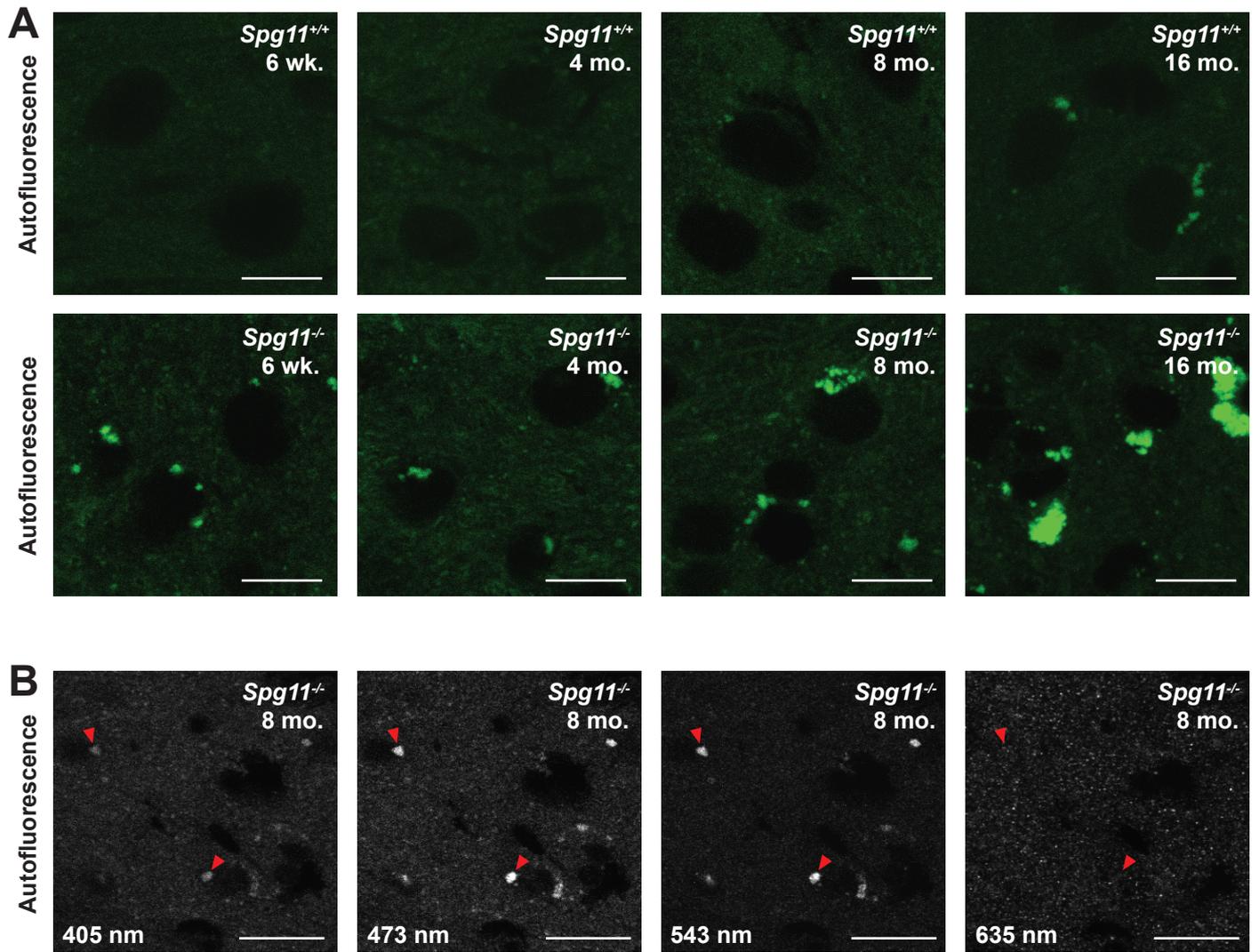
(B) Autofluorescent material, indicated by red arrowheads in *Spg11*<sup>-/-</sup> cortical motor neurons at eight months of age, upon excitation at 405, 473, 543, and 635 nm. Scale bars: 20  $\mu$ m.

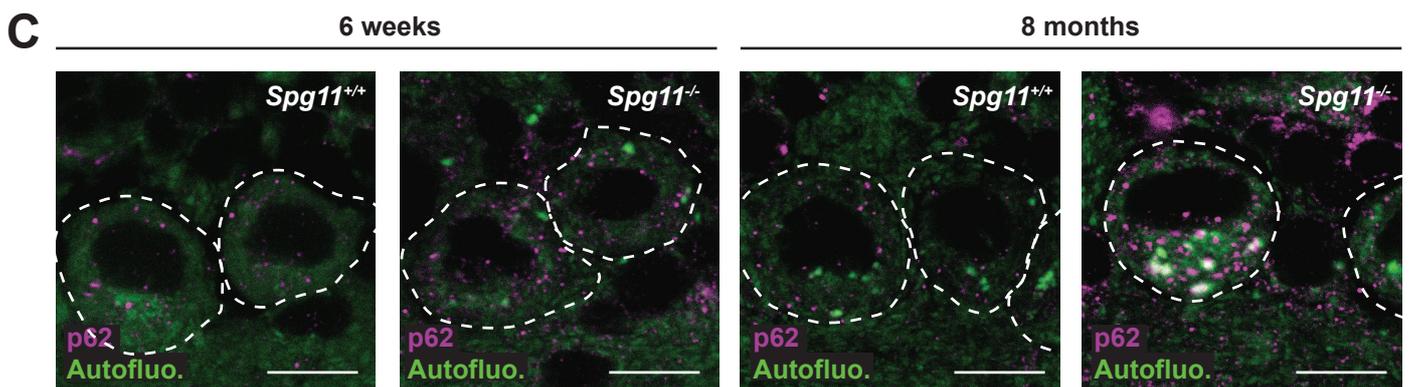
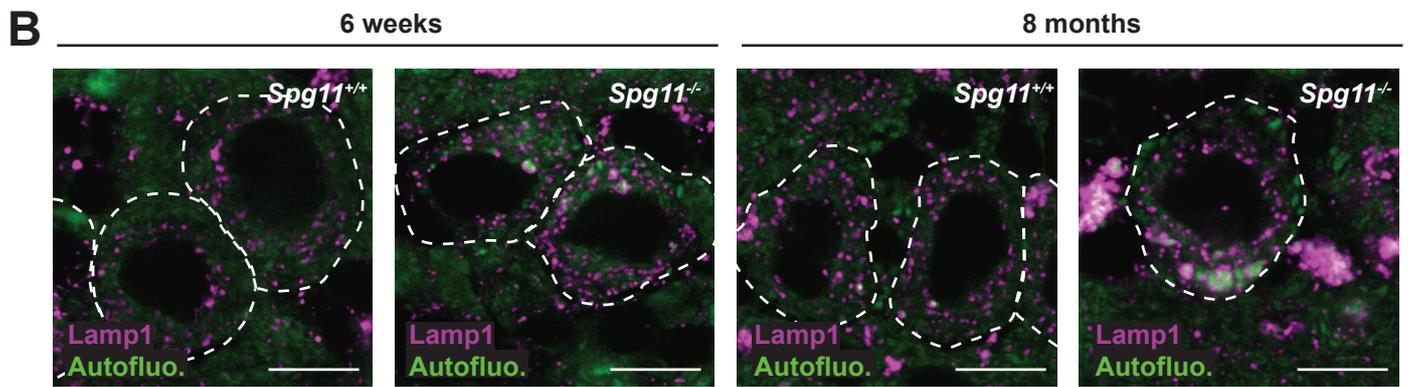
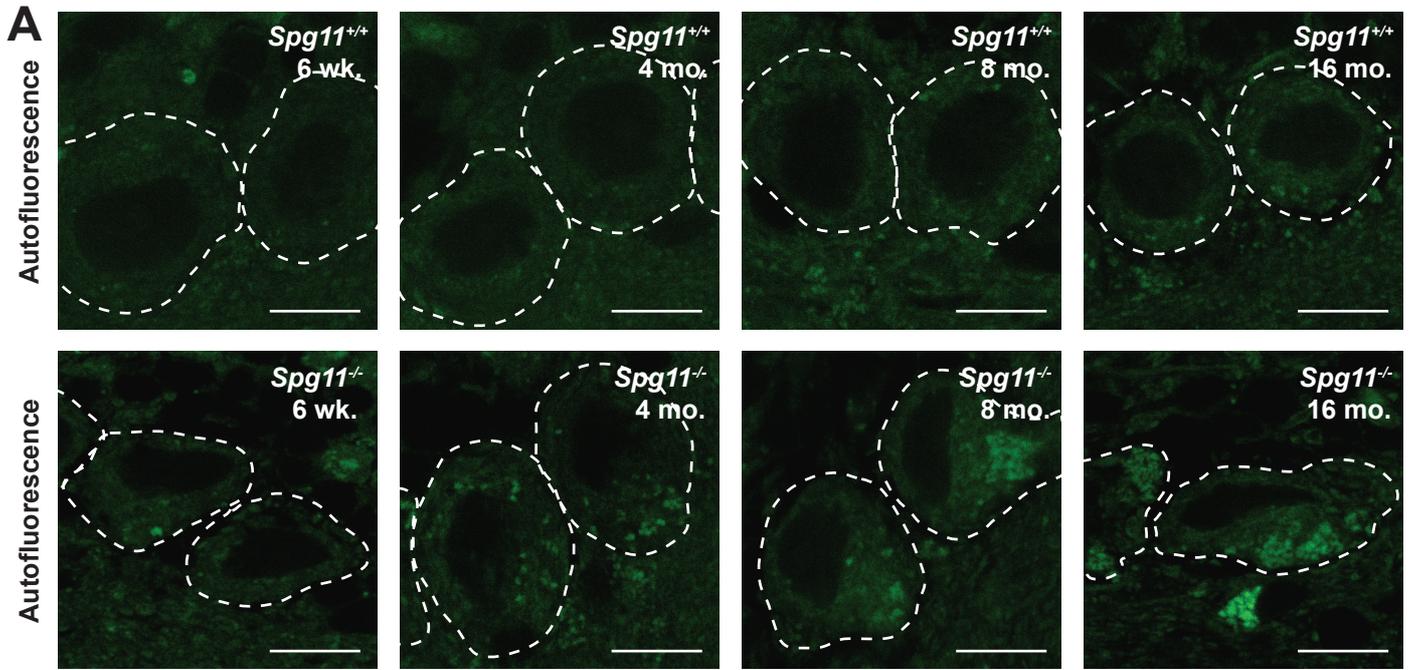
**Supplementary Figure 2: Accumulation of autofluorescent particles colocalizing with Lamp1 in cerebellar Purkinje cells of *Spg11*<sup>-/-</sup> mice**

(A) Autofluorescent material (green, excitation 488 nm, emission 515-530 nm) in *Spg11*<sup>+/+</sup> and *Spg11*<sup>-/-</sup> Purkinje cells from six-week, and 4, 8, and 16-month old animals. Knockout mice displayed autofluorescent deposits in Purkinje cells from the age of six weeks on. Scale bars: 10 μm.

(B). Lamp-1 (Magenta; Lysosome marker) immunostaining compared to autofluorescent material in *Spg11*<sup>+/+</sup> and *Spg11*<sup>-/-</sup> Purkinje cells from six-week and eight-month-old animals. Confocal microscopy images showed autofluorescent particles surrounded by Lamp-1-positive staining in knockout animals. Scale bars: 10 μm.

(C). p62 (magenta) immunostaining and autofluorescence (green) of *Spg11*<sup>+/+</sup> and *Spg11*<sup>-/-</sup> Purkinje cells at six weeks and eight months of age. Confocal microscopy images show autofluorescent particles colocalizing with p62-positive staining only in the Purkinje cells of eight-month-old *Spg11*<sup>-/-</sup> mice. Scale bars: 10 μm.





#### 4) Contribution :

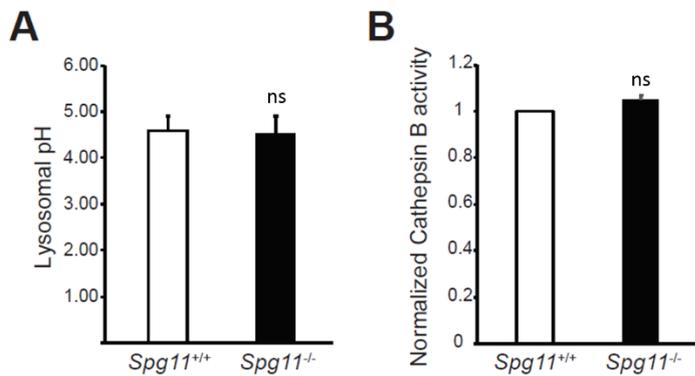
J'ai contribué à ce travail en réalisant les expériences sur les cellules du modèle murin. Les données de la littérature suggéraient un rôle de la spatacsine dans la fonction des lysosomes et la caractérisation histopathologique du modèle a montré des altérations des lysosomes avec la présence d'agrégats autofluorescents dans ces organites. Ces agrégats étant présents avant que la neurodégénérescence ne s'installe, nous avons émis l'hypothèse que les dysfonctions lysosomales sont impliquées dans la perte neuronale.

Pour confirmer ces hypothèses j'ai analysé les lysosomes des fibroblastes en utilisant la microscopie électronique en transmission. Cette technique m'a permis de distinguer et de quantifier les lysosomes normaux et les lysosomes anormaux contenant des « accumulations » osmiophile (l'osmium est le colorant utilisé en microscopie électronique), et que nous avons appelé « lysosomes with undigested materials ». Il n'y a pas de différence significative entre le nombre total de lysosomes chez les cellules sauvages et chez les cellules mutantes. Il existe toutefois une tendance à l'augmentation de ce nombre dans les fibroblastes *Spg11<sup>-/-</sup>*. Par contre la proportion de lysosomes anormaux est beaucoup plus importante chez ces derniers.

Puisque ces lysosomes contiennent des accumulations osmiophiles et que les lipides sont très osmiophiles nous avons pensé que ces accumulations pouvaient être de nature lipidique. J'ai confirmé cette hypothèse en réalisant des immunomarquages des lysosomes couplés à des marquages des lipides totaux avec le marqueur Nile Red. Cette molécule fluorescente se fixe aux lipides neutres (ce sont des lipides très hydrophobes comme les mono, di et triacylglycérol ou encore le cholestérol) et émet dans le spectre rouge. Pour quantifier l'accumulation de lipides dans les lysosomes j'ai mesuré l'intensité de fluorescence du Nile Red dans l'ensemble de la cellule et l'intensité du marquage dans les lysosomes (marquage du Nile Red qui colocalise avec le marquage Lamp1). Nous avons exprimé la colocalisation entre le Nile Red et le marquage Lamp1 en pourcentage de marquage Nile Red compris dans les lysosomes. Des images de différents plans successifs en Z ont été prises à l'aide d'un microscope à épifluorescence équipé d'un système piézo-électrique et ont été déconvoluées pour atteindre une résolution qui permet d'évaluer la colocalisation des deux marquages. Ces expériences m'ont permis de confirmer que les accumulations dans les lysosomes sont de nature lipidique.

Cette accumulation de lipides ne semble pas résulter d'un changement du pH ou de l'activité enzymatique (Figure 29). Nous avons donc voulu tester si elle n'était pas la conséquence d'un problème d'efflux et de trafic des lipides des lysosomes vers les autres organites. Pour tester cette

hypothèse j'ai activé le processus autophagique dans les cellules par déprivation en acides aminés. Dans ces conditions, des membranes cellulaires sont encapsulées dans des autophagosomes et amenés dans les lysosomes pour être dégradées puis recyclées. La mesure de la colocalisation entre les lipides et les lysosomes après différents temps de déprivation a montré que les lysosomes des cellules sauvages et mutantes accumulent des lipides pendant la déprivation. Après un temps de déprivation, les lipides sont effectivement transférés des lysosomes vers d'autres organites et la diminution de la colocalisation entre les lipides et lysosomes est plus faible chez les cellules mutantes.



**Figure 29: (A) Mesure du pH des lysosomes des fibroblastes sauvages et mutés pour le gène *Spg11*. La mesure a été effectuée à l'aide du Lysosensor qui est une sonde dont la fluorescence dépend du pH. (B) Mesure de l'activité catalytique de la cathepsin B. Les cellules ont été mises en présence du Magic Red qui est un substrat de la cathepsin B qui fluoresce lorsqu'il est clivé par l'enzyme.**

Il a été proposé que les acides gras hydrolysés par les lysosomes, pendant l'autophagie, sont stockés dans les gouttelettes lipidiques (Rambold et al., 2015). Dans nos conditions, une déprivation soutenue (24h) entraîne une très forte augmentation du nombre de gouttelettes lipidiques ce qui soutient cette hypothèse. J'ai utilisé le logiciel Icy pour détecter et compter les gouttelettes lipidiques. Le nombre de ces gouttelettes est diminué aussi bien dans des conditions basales qu'après 24h de déprivation dans les cellules *Spg11*<sup>-/-</sup>. Ces résultats suggèrent donc que le recyclage des lipides par les lysosomes ainsi que leurs efflux sont altérés en absence de spatacine.

Comme les neurones sont les cellules les plus affectées par la perte de fonction de la spatacine dans la PSH de type SPG11 j'ai testé si les altérations retrouvées dans les fibroblastes sont aussi présentes dans des neurones en culture. Le nombre de lysosomes contenant du matériel non digéré est aussi augmenté dans les neurones *Spg11*<sup>-/-</sup>. Ces lysosomes accumulent, comme dans les fibroblastes, des lipides et le nombre de gouttelettes lipidiques est diminué. Ces résultats suggèrent que l'efflux de lipides des lysosomes vers les autres organites est altéré par l'absence de spatacine dans les neurones.

J'ai effectué les expériences et analyses sur les fibroblastes murins ainsi que sur les neurones en cultures. J'ai aussi été impliqué dans la réflexion scientifique et la conception des expériences

menées sur les cellules. En ce qui concerne l'écriture du manuscrit j'ai préparé la figure 9 et écrit la partie du matériel et méthode sur les cellules.

## 5) Discussion :

Le modèle murin de la PSH de type *SPG11* généré au laboratoire développe des troubles moteurs qui s'aggravent avec le temps et qui sont détectés à un âge précoce de 6 semaines. Ces observations sont cohérentes avec la pathologie humaine puisque les premiers symptômes apparaissent souvent lors de la première décennie de la vie des patients (Stevanin et al., 2007). De la même manière nous avons pu mettre en évidence la présence de troubles cognitifs chez ces souris.

Plusieurs régions du système nerveux dégèrent progressivement. C'est le cas notamment du cortex moteur ou du cervelet. De plus des dystrophies axonales ont été observées dans le faisceau corticospinal. La jonction neuromusculaire est aussi altérée chez les souris *Spg11<sup>-/-</sup>* et on note une perte de force musculaire aux stades avancés de la maladie. Ces observations sont en accord avec l'implication de mutations du gène *SPG11* dans des formes rares de SLA et de CMT (Daoud et al., 2012; Montecchiani et al., 2016; Orlacchio et al., 2010). Notre modèle récapitule donc la majorité des symptômes retrouvés chez les patients.

La caractérisation de notre modèle met en lumière certaines différences avec le premier modèle murin *SPG11* publié (Varga et al., 2015). En effet, les premiers phénotypes moteurs apparaissent beaucoup plus tôt dans notre modèle (6 semaines contre 12/13 mois) et nous avons observé une atrophie du corps calleux, une neuropathie périphérique ainsi que des troubles cognitifs. Ces problèmes n'avaient pas été reportés dans l'étude de l'équipe allemande (Varga et al., 2015). Les différences entre les deux modèles peuvent avoir plusieurs origines.

Tout d'abord la stratégie d'inactivation du gène est différente et des isoformes ou des protéines tronquées pourraient subsister dans l'un des modèles et expliquer certaines des différences. Nous ne disposons que d'anticorps reconnaissant la partie C-terminale de la protéine et n'avons par conséquent pas été en mesure de déterminer si des formes tronquées de la protéine sont présentes. Ces différences pourraient aussi représenter la grande variabilité des symptômes des patients. En effet, des mutations identiques chez des individus apparentés peuvent en effet induire des signes cliniques différents (Daoud et al., 2012).

Comme le suggéraient les études précédentes sur les fonctions de la protéine, nous avons observé une altération de la fonction des lysosomes. Du matériel autofluorescent s'accumule dans les lysosomes, comme c'est le cas dans un modèle murin *SPG15* qui est une forme clinique très proche de la PSH de type *SPG11* (Khundadze et al., 2013). Ces accumulations s'aggravent avec le

temps mais sont observables à des temps très précoces, avant l'apparition des premiers symptômes comme le montre nos analyses des cellules embryonnaires par microscopie électronique. Les accumulations dans les lysosomes sont de nature lipidique et l'efflux des lipides des lysosomes vers d'autres organites dont les gouttelettes lipidiques est diminué. La diminution de cet efflux pourrait à lui seul expliquer l'accumulation de lipides.

Le rôle moléculaire de la spatacsine dans ces problèmes lysosomaux est toujours en suspens. Comme la protéine est localisée en partie au niveau des lysosomes (Hirst et al., 2013) elle pourrait faire partie d'une machinerie de transport de lipides au niveaux des lysosomes, ou bien sa perte de fonction pourrait perturber la fonction d'une telle machinerie en étant responsable de modifications du métabolisme ou de l'homéostasie cellulaire. Les liens entre ces accumulations et le rôle supposé de la protéine dans la reformation des lysosomes nécessitent d'être évalués par des expériences complémentaires.

## **6) Conclusion :**

Le modèle murin de la PSH de type SPG11 que nous avons caractérisé récapitule l'ensemble des symptômes de la pathologie humaine. C'est donc un bon modèle pour l'étude de la pathologie, des mécanismes physiopathologiques et pour tenter de trouver et développer de nouvelles approches thérapeutiques. Ce modèle permet aussi l'étude des liens entre les dysfonctions des lysosomes et la neurodégénérescence.

La perte de fonction de la spatacsine perturbe le métabolisme lipidique en altérant l'efflux des lipides des lysosomes ce qui induit une accumulation de lipides dans ces organites. Les mécanismes cellulaires en cause et le spectre complet des altérations cellulaires qui sont touchées et ont une implication dans le développement de la pathologie, sont toutefois toujours méconnus.

De plus la nature des lipides qui s'accumulent reste inconnue et a été l'objet des articles présentés dans la suite de ce manuscrit.



## II) Article 2 : Les gangliosides et la reformation des lysosomes dans les neurones :

**Ganglioside accumulation impedes lysosomal membrane recycling and promotes neurodegeneration.**

Maxime Boutry, Julien Branchu, Céline Lustremant, Julie Pernelle, Raphaël Matusiak, Alexandre Seyer, Marion Poirel, Benoit Colsch, Alexandre Pierga, Kostantin Dobrenis, Alexandra Durr, Alexis Brice, Fanny Mochel, Khalid El Hachimi, Giovanni Stevanin, Frederic Darios

(En Préparation)

### 1) Introduction :

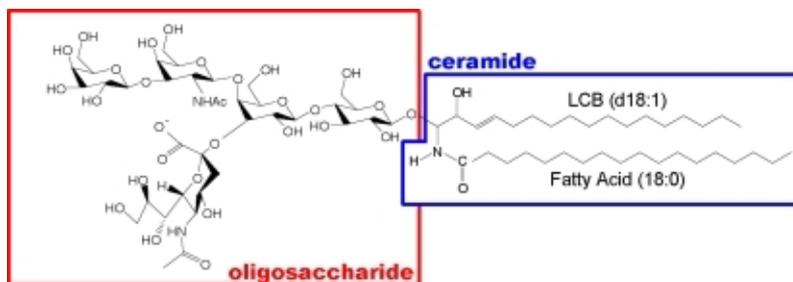
La caractérisation du modèle murin SPG11 que nous avons effectuée a montré que ce modèle récapitule les principaux symptômes de la pathologie humaine et que des dysfonctions des lysosomes semblent être impliquées dans la perte neuronale. Les lysosomes accumulent des lipides et leur transfert vers d'autres organites semble être défectueux (Branchu et al., 2017).

Ce modèle est pertinent pour étudier les liens entre les dysfonctions des lysosomes et le processus neurodégénératif, en particulier les altérations de la reformation des lysosomes dans laquelle la spatascine semble jouer un rôle (Chang et al., 2014). Ce processus apparaît très important pour la survie des neurones puisque la majorité des protéines impliquées dans ce mécanisme sont associées à des maladies neurodégénératives (Chang et al., 2014; Magalhaes et al., 2016; Rong et al., 2011). Toutefois, la reformation des lysosomes est perturbée dans plusieurs MSL, probablement en conséquence des accumulations massives de matériels (lipides et sucres notamment) qui peuvent empêcher le bon fonctionnement de diverses machineries protéiques dans les lysosomes (Platt et al., 2012). Les processus cellulaires altérés semblent dépendre de la nature des macromolécules qui s'accumulent ainsi que de la gravité de ces accumulations. La PSH SPG11 partage certaines caractéristiques avec les MSL : pathologie neurodégénérative qui survient souvent pendant l'enfance et présence d'accumulations au sein des lysosomes. Il faut toutefois noter que, dans le cas de la PSH de type SPG11, les accumulations sont moins importantes que dans les MSL.

Nous avons donc cherché à comprendre les liens entre les accumulations de lipides dans les lysosomes et les problèmes de reformation ou de recyclage de ces compartiments. Les lipides s'accumulant dans les lysosomes pourraient perturber leur recyclage, comme c'est le cas dans plusieurs MSL (Platt et al., 2012) ou bien en être une conséquence. Pour étudier cela nous avons choisi dans un premier temps d'identifier les espèces lipidiques s'accumulant dans les lysosomes par des techniques de lipidomique avant de poursuivre nos investigations en utilisant des neurones embryonnaires en culture.

## Les gangliosides :

Les gangliosides sont des glycolipides exprimés dans les membranes cellulaires. On dénombre près de 200 gangliosides différents chez les vertébrés. Ils sont principalement retrouvés dans les cellules nerveuses et sont composés d'un céramide et d'une chaîne oligosaccharidique qui se termine par des résidus d'acides sialiques (Figure 30). La partie céramide est hydrophobe et enchâssée dans le feuillet externe de la membrane. Le nombre et la position des acides sialiques déterminent l'identité du ganglioside et donc ses fonctions. Les gangliosides peuvent par exemple participer à la régulation de l'activité de récepteurs protéiques situés dans la même membrane (Kabayama et al., 2007) ou encore jouer un rôle dans la reconnaissance cellulaire et les contacts cellule-cellule (Schnaar, 2010). Dans le système nerveux central les principaux gangliosides sont le GM1 et GD1 qui sont particulièrement enrichis au niveau de la membrane plasmique des neurones.



**Figure 30: Structure d'un ganglioside (ici le ganglioside GM1a). Les gangliosides sont composés d'une partie céramide et d'une partie oligosaccharidique (Sugiura et al., 2008).**

La synthèse des gangliosides commence dans le RE avec le glucosylcéramide qui est transformé en lactosylcéramide et se poursuit ensuite dans l'appareil de Golgi. C'est une synthèse étape par étape ou différentes enzymes rajouteront séquentiellement les acides sialiques. A ce jour deux pathologies sont connues pour être causées par des mutations dans des gènes impliqués dans la synthèse des gangliosides : la PSH de type SPG26 qui associe troubles moteurs et invalidité intellectuelle et qui résulte de mutations dans le gène *B4GALNT1* codant la GM2-synthase (Boukhris et al., 2013); et des mutations dans le gène *ST3GAL5* codant la GM3-synthase sont en cause dans des crises d'épilepsies infantiles (Boccutto et al., 2014).

Le catabolisme des gangliosides, qui se déroule dans le système endolysosomal après endocytose des gangliosides de la membrane plasmique, se fait lui aussi séquentiellement par action d'hydrolases (Figure 31). Les 4 principaux gangliosides du cerveau sont : GM1, GD1a, GD1b et GT1b. Lors de leur endocytose ils seront ainsi catabolisés dans les lysosomes. Dans certaines pathologies où la dégradation est déficiente suite à la perte de fonction de l'une des hydrolases on peut observer l'accumulation de certains gangliosides spécifiques. Par exemple les gangliosidoses à GM2 (Maladies de Sandhoff et Tay-Sachs) sont causées par des mutations dans les gènes codant les  $\beta$ -hexosaminidases A et B et de la protéine activatrice de l'hexosaminidase (Sandhoff and Harzer, 2013). Cette enzyme réalise l'hydrolyse du GM2 en GM3, un déficit de son

activité induit donc une accumulation du GM2 qui n'est plus catabolisé efficacement. Certains lipides (comme le cholestérol) peuvent être recyclés dans les lysosomes. Ce n'est pas le cas des gangliosides qui semblent être dégradés en céramides, oses et acide sialiques et ce sont ces molécules qui peuvent être recyclées pour la synthèse de gangliosides dans le RE et l'appareil de golgi (Figure 31).

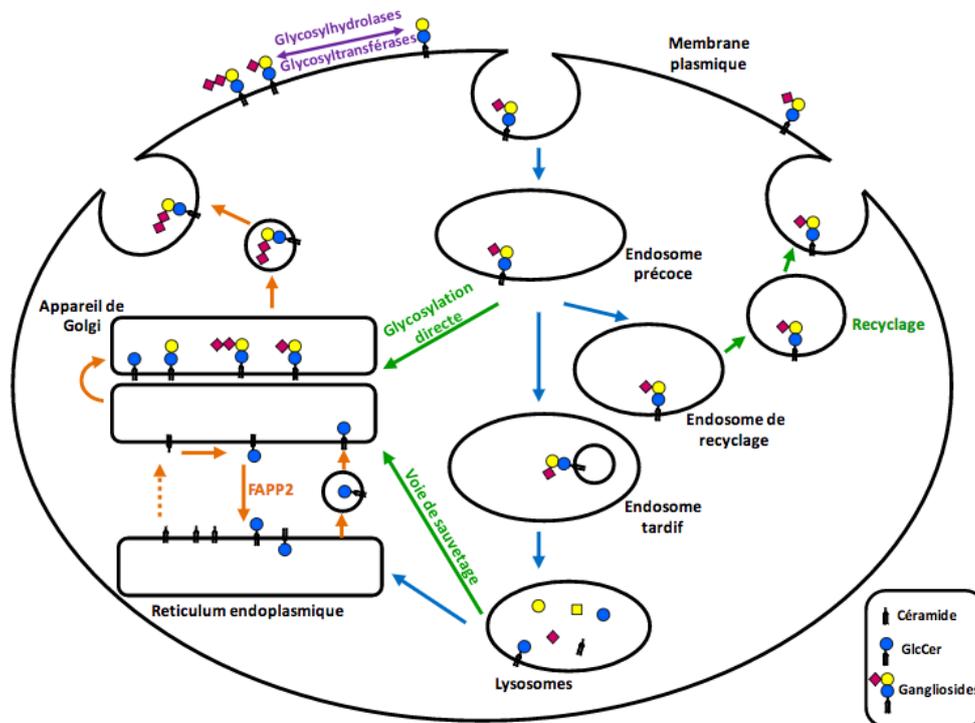


Figure 31: Schéma de la synthèse et du catabolisme des gangliosides. La synthèse débute dans le RE et se poursuit dans l'appareil de Golgi, les gangliosides synthétisés sont adressés à la membrane plasmique. Ces gangliosides seront recyclés par catabolisme dans le système endolysosomal. Les gangliosides sont endocytés et les endosomes vont fusionner avec les lysosomes pour la dégradation de ces glycolipides (Agata Steenackers, thèse 2013, « Etude du rôle de la GD3 synthétase et des gangliosides complexes dans la prolifération et la migration des cellules de cancer du sein »).

## 2) Résumé :

Le point de départ de cette seconde étude, qui avait pour but de déterminer les liens entre la spatascine, les accumulations de lipides, les altérations de la reformation des lysosomes et la mort neuronale, est l'identification des espèces lipidiques qui s'accumulent dans le système lysosomal. Des analyses de lipidomique par utilisation de la technique de spectrométrie de masse ont été effectuées sur les lipides extraits de cortex de cerveaux ainsi que sur des fractions enrichies en lysosomes, purifiées à partir de cerveaux de souris sauvages et *Spg11<sup>-/-</sup>* âgées de 8 mois. Cette analyse a montré que les principaux lipides s'accumulant sont les gangliosides simples : GM2, GM3, GD2 et GD3. Ces accumulations ont été confirmées par des immunomarquages de ces gangliosides dans

des coupes de cerveaux de souris mutantes. Afin de valider les biomarqueurs dans la pathologie humaine, nous avons généré des organoïdes corticaux à partir de cellules IPS dérivées de cellules de patients atteints par la PSH de type SPG11 ou de sujets sains. Les gangliosides s'accumulent aussi dans les organoïdes corticaux de patients. Ce résultat confirme la pertinence de l'étude du rôle de ces accumulations de gangliosides pour la pathologie humaine. Nous avons reproduit ces résultats en utilisant des neurones embryonnaires en culture. Le ganglioside qui s'accumule le plus est le ganglioside GM2. Nous l'avons donc choisi comme marqueur de niveau des gangliosides.

Comme la perte de fonction de la spatacine induit l'augmentation du nombre d'autolysosomes, probablement par l'altération de la reformation des lysosomes nous avons cherché à déterminer si les accumulations de gangliosides et d'autolysosomes sont liées. Nous avons observé que le ganglioside GM2 s'accumule en particulier dans les autolysosomes dans les neurones *Spg11<sup>-/-</sup>*. La proportion d'autolysosomes et plus particulièrement celle contenant du GM2 augmente avec le temps. La diminution des niveaux de GM2 dans les cellules, par inhibition pharmacologique de leur synthèse (Miglustat) ou via l'utilisation d'ARN interférent ciblant l'expression de la GM3 synthase, permet de diminuer le nombre d'autolysosomes dans les cellules mutantes. Inversement, l'inhibition de la dégradation des gangliosides dans les lysosomes, qui promeut leur accumulation, entraîne l'augmentation du nombre d'autolysosomes. Ces résultats suggèrent que l'accumulation de gangliosides a un effet délétère sur le recyclage des lysosomes à partir d'autolysosomes.

Nous avons par la suite montré que les gangliosides accumulés dans les autolysosomes perturbent le recrutement de certains acteurs de l'ALR. Les niveaux de clathrine sont augmentés dans les lysosomes contenant du GM2 et le recrutement de la Dynamin1, impliquée dans la fission des vésicules et tubules de lysosomes dans l'ALR, est fortement réduit. Le recyclage des lysosomes est ainsi perturbé par l'accumulation de gangliosides.

Enfin, j'ai pu montrer que ces accumulations de gangliosides contribuent à la mort neuronale. Les cellules *spg11<sup>-/-</sup>* sont plus sensibles à la mort induite par le glutamate. La diminution des niveaux de gangliosides corrige cette sensibilité tandis que l'augmentation des gangliosides dans les lysosomes sensibilise les cellules à cette mort induite par le glutamate.

Notre étude identifie les gangliosides comme biomarqueurs de la PSH SPG11 et acteurs clefs du recyclage des autolysosomes. Leurs accumulations, retrouvées dans de nombreuses pathologies neurodégénératives, sont délétères pour la survie des neurones. Cibler les niveaux de gangliosides pourrait ainsi représenter une potentielle approche thérapeutique.

### **3) Article 2 :**

**Ganglioside accumulation impedes lysosomal  
membrane recycling and promotes  
neurodegeneration**



# **Ganglioside accumulation impedes lysosomal membrane recycling and promotes neurodegeneration**

## **Authors and affiliations:**

Maxime Boutry<sup>1-5\*</sup>, Julien Branchu<sup>1-4\*</sup>, Céline Lustremant<sup>1-4</sup>, Julie Pernelle<sup>1-4</sup>, Raphaël Matusiak<sup>1-4</sup>, Alexandre Seyer<sup>6+</sup>, Marion Poirel<sup>6</sup>, Benoit Colsch<sup>7</sup>, Alexandre Pierga<sup>1-4</sup>, Kostantin Dobrenis<sup>8</sup>, Alexandra Durr<sup>1-4,9</sup>, Alexis Brice<sup>1-4</sup>, Fanny Mochel<sup>1-4,9,10</sup>, Khalid Hamid El Hachimi<sup>1-5</sup>, Giovanni Stevanin<sup>1-5,9</sup>, Frédéric Darios<sup>1-4</sup>

1: Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, UMR\_S 1127, F-75013, Paris, France

2: Inserm, U1127, F-75013, Paris, France

3: CNRS, UMR 7225, F-75013, Paris, France

4: Institut du Cerveau et de la Moelle Epinière, ICM, F-75013, Paris, France

5: Ecole Pratique des Hautes Etudes, PSL Research University, Laboratoire de Neurogénétique, F-75013, Paris, France

6: Profilomic SA, F-92100, Boulogne-Billancourt, France

7: CEA/Centre d'Etudes de Saclay, DRF/Institut Joliot/SPI/LEMM, Université Paris-Saclay, MetaboHUB, F-91191, Gif-sur-Yvette, France

8: Dominick P. Purpura Department of Neuroscience, Albert Einstein College of Medicine, Bronx, NY 10461, USA

9: National reference center for neurogenetic diseases, Pitié-Salpêtrière University Hospital, APHP, Paris, France

10: Bioclinic and Genetic Unit of Neurometabolic Diseases, Pitié-Salpêtrière University Hospital, F-75013, Paris, France

\*equal contribution

+Present address: MedDay Pharmaceuticals, Paris

**Correspondence:** Frédéric Darios or Giovanni Stevanin

Institut du Cerveau et de la Moelle Epinière

INSERM U1127, CNRS UMR 7225, UPMC UMR S 1127

Hôpital de la Salpêtrière

47, boulevard de l'Hôpital

F-75013 France

Tel: (+33) 1 57 27 46 52

Fax: (+33) 1 57 27 46 95

E-mail: [frederic.darios@upmc.fr](mailto:frederic.darios@upmc.fr) (F.D.); [giovanni.stevanin@upmc.fr](mailto:giovanni.stevanin@upmc.fr) (G.S.)

**Abstract:**

Lysosome recycling after autophagy is an essential mechanism for maintaining the pool of functional lysosomes. Alteration of this process leads to autolysosome accumulation. Most proteins involved in lysosome recycling are encoded by genes responsible for neurodegenerative diseases when mutated. However, its mechanisms have only been investigated in non-neuronal models. Here, we investigated the role of one key player of lysosome recycling in neurons, spatacsin that is encoded by *SPG11*, a gene responsible for a severe form of hereditary spastic paraplegia when mutated. We showed that loss of spatacsin led to the accumulation of simple gangliosides in autolysosomes in a knockout mouse model, primary cultures of neurons and neurons of cortical organoids derived from induced pluripotent stem cells of *SPG11* patients. By preventing gangliosides synthesis in *Spg11* knockout cells or by inducing their accumulation in lysosomes in wild-type cells, we demonstrated that elevated concentrations of gangliosides in lysosomes blocked their recycling and promoted the accumulation of autolysosomes contributing to neuronal death. Our results identify gangliosides as pathological biomarkers in *SPG11*, and as key players in the recycling of lysosomes and the accumulation of autolysosomes. This has broad implications as there are many diseases that involve ganglioside accumulations for which therapeutic options are limited or unavailable.

## Introduction

Lysosomes are essential organelles necessary for the degradation of cellular components, such as proteins, glycoconjugates, nucleic acids, and complex lipids, due to the action of hydrolytic enzymes. They are also involved in endocytosis and autophagy pathways to promote the degradation of the content of late endosomes and autophagosomes. The degradation step is followed by recycling of structural components into newly forming lysosomes. Under normal conditions, recycling of lysosomal membranes has been proposed to result from the budding of small vesicle carriers from lysosomes (1). However, under starvation conditions, tubulation occurs in autolysosomes to promote the reformation of new functional lysosomes, a process called autophagic lysosome reformation (ALR) (2). The proteins involved in tubulation include kinesin KIF5B (3), clathrin, lipid modifying enzymes PIP5K1B and PIP5K1A (4), the lysosomal enzyme glucocerebrosidase (GBA1) (5), spatacsin and spastizin (6), members of the AP-2 and AP-4 complex (4), and SPNS1 (7). Most of these proteins are associated with neurodegenerative disorders. Mutations in the genes encoding the subunits of the AP4 complex, as well as those encoding spatacsin and spastizin account for severe neurodegenerative disorders, known as hereditary spastic paraplegias (8). Biallelic mutations in *GBA1* are responsible for neuropathic forms of Gaucher Disease with variable degrees of intellectual disability, epilepsy, and motor deficit (9), whereas heterozygous *GBA1* mutations are a major risk factor identified to date for Parkinson Disease (9). In addition, loss of function of spinster, the drosophila homolog of SPNS1, leads to neurodegeneration (10). These data highlight the importance of the lysosome recovery pathway for neuron survival. However, lysosomal tubulation required for ALR has so far only been observed in cultured non-neuronal cells. The accumulation of autolysosomes in neurons of a knockout mouse lacking spatacsin was proposed as evidence that defective autophagic lysosome recovery can contribute to neurodegeneration (11).

Several of the proteins involved in the tubulation of lysosome membranes are directly implicated in membrane curvature in various subcellular compartments, such as clathrin, AP-2 and AP-4 complexes (12). In contrast, GBA1 is involved in glucosphingolipid degradation (5) and SPNS1 is a putative lysosomal H<sup>+</sup>-carbohydrate transporter (13), suggesting that changes in lysosomal metabolism can alter ALR. Recently, we implicated the loss of spatacsin, a protein required for the initiation of ALR (6), in lysosomal accumulation of lipids in the cortex and cerebellum of a knockout mouse model (14), therefore linking lysosome tubulation to local lipid metabolism. Spatacsin is

encoded by the *SPG11* gene (15). Mutations in this gene lead to a spastic gait disorder variably associated with cognitive impairment, peripheral neuropathy, cerebellar ataxia, parkinsonism, and retinal degeneration (15-17). Most mutations found in SPG11 patients are nonsense or frameshift mutations predicted to result in a loss of spatacsin function (15). Knocking out *Spg11* in mice is responsible for early cognitive and motor deficits, consistent with the symptoms observed in the majority of patients with mutations in the *SPG11* gene (14). The accumulation of lipids that was observed in the brain of *Spg11* knockout mice was also detected in post-mortem samples of an SPG11 patient brain (14). However, the nature of the lipids that accumulate in lysosomes is not known. Furthermore, whether the accumulation of lipids in lysosomes contributes to or is a consequence of impairment of lysosomal membrane recovery must be investigated.

Here, we show that loss of spatacsin leads to the accumulation of simple gangliosides (GM3, GM2, GD3, and GD2) in autolysosomes of animal and human-derived models. Decreasing ganglioside levels prevented the accumulation of autolysosomes in cultured neurons and improved neuron survival upon exposure to glutamate. Conversely, increasing ganglioside levels in control neurons induced the accumulation of autolysosomes and impaired neuron survival, highlighting the detrimental role of gangliosides in autolysosome accumulation and neuronal death.

## Results

### Loss of spatacsin promotes the progressive accumulation of gangliosides in lysosomes in neurons

Loss of spatacsin function leads to lysosomal accumulation of lipids in cortical and cerebellar neurons in mice (14). We investigated the nature of the lipids that accumulate in the cerebral cortex of *Spg11*<sup>-/-</sup> mice by performing a lipidomic analysis. Lipids were extracted from the cortex of eight-month-old mice and analyzed by liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry. The levels of free fatty acids, ceramides, and lysophospholipids were significantly lower in the cortex of *Spg11* knockout mice than control mice. Amongst the various classes of lipids, only GM2 levels were significantly higher in the cortex of *Spg11*<sup>-/-</sup> mice than in control mice (Table 1). We assessed the accumulation of GM2 in the cortical neurons of *Spg11*<sup>-/-</sup> brains, to validate these data, using a specific antibody. Immunostaining showed that GM2 colocalized with lysosomes in knockout mice, from the age of six weeks, whereas it was seen as rare small punctae in neurons of control mice (Fig. 1A). Quantification of the fluorescence intensity showed that GM2 levels were higher in *Spg11*<sup>-/-</sup> than control cortical neurons at all ages (Fig. 1B). Quantification of the variance of the fluorescence intensity, which is an indication of non-homogenous distribution of the staining, strongly increased with age in knockout tissues (Fig. 1B). Accordingly, GM2 accumulated in large lysosomes in knockout mice as indicated by the colocalization of GM2 and Lamp1 staining (Fig. 1A). These data show that the loss of spatacsin function led to early and progressive accumulation of the GM2 ganglioside in the lysosomes of neurons in the cerebral cortex.

Our lipidomic analysis was performed on the whole cortex. It is thus possible that other lipids may accumulate in lysosomes despite the absence of a global change in their levels. It is also possible that some lipids were not detected because of (i) their low level in total lipid extracts and/or (ii) ion suppression effects due to the presence of several lipid classes, including highly intense phospholipids. Therefore, we purified fractions enriched in lysosomes from the brains of *Spg11*<sup>+/+</sup> and *Spg11*<sup>-/-</sup> mice (Suppl. Fig. 1), and extracted lipids using the Folsch procedure (44). Lipidomic analysis was performed on the Folsch upper phase, which contains gangliosides. The levels of gangliosides GM2, GM3, GD2, and GD3 were markedly higher in lysosomal fractions obtained from *Spg11*<sup>-/-</sup> mouse brains than those of control brains (Table 2). We confirmed the enrichment of these gangliosides in

lysosomes by immunostaining with specific antibodies. The lipids GM3, GD2, and GD3 were colocalized with lysosomes, as GM2 was. Quantification of fluorescence intensity showed that the levels of the four lipid species increased with age and were higher in *Spg11*<sup>-/-</sup> mouse brains than control brains (Fig. 1 C-E). Quantification of the variance of the fluorescence intensity increased with age in knockout tissues, consistent with their accumulation in large lysosomes. The levels of complex gangliosides (GM1, GD1, and GT1) were slightly, but not significantly higher in the lysosome-enriched fractions (Table 2). Accordingly, there was no difference in the localization of GM1 between *Spg11*<sup>+/+</sup> and *Spg11*<sup>-/-</sup> mouse brain as assessed by immunostaining (data not shown).

### **Loss of spatacsin promotes the early accumulation of gangliosides in lysosomes in human neurons**

We tested whether the accumulation of gangliosides is also relevant for human pathology using induced pluripotent stem (iPS) cells derived from fibroblasts of two independent SPG11 patients and differentiated them into brain organoids. Patient SPG11-1 carried two heterozygous truncating mutations *in trans* (c.2431 C>T, pGln811X; deletion of exon 29). This patient had normal intellectual development, and experienced gait difficulties by age 14, gradually worsened and became stick-dependent at age 20. Examination at age 23 showed that she could still walk with sticks. Spasticity and weakness was present in the lower limbs while tone and strength was normal in the upper limbs. She had increased reflexes with ankle clonus and bilateral extensor plantar reflex as well as Hoffman sign in the upper limbs. Deep sensation was normal. She had postural tremor in the arms, normal eye gaze and no cognitive impairment. There was no evident cerebellar sign. Patient SPG11-2 carried two heterozygous truncating mutations *in trans* (c.1951 C>T, pArg651X; c.5623 C>T, pGln1875X). This woman had onset of spastic gait at age 17. At age 27, she presented with moderate spastic gait, needing walking aids since age 26, and more recently a wheelchair. She had increased reflexes in lower limbs, including bilateral extensor plantar reflexes and Hoffman signs were present in the upper limbs. She had moderate weakness in the legs and decreased deep sensation at the ankles. Bradykinesia was evident and the finger-nose test was performed with mild tremor. Cognition was clinically normal and she exhibited no abnormal eye movements. Cerebral imaging showed a thin *corpus callosum*. Fibroblasts of two sex- and age-matched controls were also used to derive iPS cells. We validated the iPS cell lines with markers of pluripotency (Suppl. Fig. 2).

iPS cells of SPG11 patients and healthy subjects were differentiated into brain organoids with predominant cortical identity *in vitro* using a free floating tridimensional culture method (18). After 90 days of differentiation, the organoids were organized in layers of radial glial cells labeled by Pax6 and Nestin, and peripheral layers of neurons that expressed  $\beta$ III-tubulin and NeuN (Fig 2A and data not shown). We examined whether gangliosides accumulated in lysosomes in the peripheral layer of neurons using antibodies directed against these lipid species (Fig. 2B-F). GM2, GM3, and GD3 had a punctuate localization in the neurons of the peripheral layer of control and SPG11 brain organoids, and they largely colocalized with lysosomes in the neurons of the SPG11 brain organoids (Fig. 2B, and data not shown). Quantification of fluorescence intensity showed GM2 and GM3 levels to be higher in SPG11 cortical organoids than control organoids (Fig. 2C-F). Furthermore, the variance of the fluorescence intensity of GM2, GM3, and GD3 staining was also higher in organoids derived from SPG11 patients than those derived from healthy controls, consistent with their accumulation in lysosomes. There was no difference in GD2 staining between organoids derived from SPG11 patients and healthy controls, in agreement with the lack of a difference in GD2 staining in the cortices of *Spg11<sup>+/+</sup>* and *Spg11<sup>-/-</sup>* mice at early stages (Fig. 1D). Overall, these data show that simple gangliosides accumulated in lysosomes of the human neurons, starting at early stages of development represented by the cortical organoid model (18).

### **Spatacsin loss promotes simple ganglioside accumulation in autolysosomes in primary cultures of cortical neurons**

We analyzed whether gangliosides also accumulated in lysosomes of primary cultures of cortical neurons derived from *Spg11<sup>-/-</sup>* mouse embryos, as gangliosides accumulated in brain organoids, which are embryonic-like structures (18). GM2, GM3, GD2, and GD3 significantly accumulated in lysosomes in cultured neurons derived from *Spg11<sup>-/-</sup>* embryos (Fig. 3). Primary cultures of cortical neurons are thus a good model to investigate the consequences of ganglioside accumulation on cellular function. GM2 was the ganglioside that accumulated the most in lysosomes and we therefore used it as a marker for ganglioside accumulation in subsequent experiments.

We then investigated the consequences of ganglioside accumulation on lysosomal function of *Spg11* knockout neurons. Loss of spatacsin impairs autophagic clearance and results in accumulation of autolysosomes (6, 11). Accordingly, the proportion of lysosomes that were autolysosomes, defined

by positive staining for the lysosomal marker Lamp1 and the autophagic marker p62, was higher in *Spg11<sup>-/-</sup>* neurons than in control neurons and this proportion increased over time in cultured *Spg11<sup>-/-</sup>* neurons (Fig. 4A). We then investigated whether GM2 contributed to increase the proportion of autolysosomes. Close examination of GM2 staining in neurons showed that it mainly accumulated in a subset of lysosomes that were also stained with p62 (Fig. 4B). The proportion of lysosomes stained with p62 and GM2 antibodies was higher in *Spg11<sup>-/-</sup>* neurons than in control neurons and increased over time (Fig. 4C), suggesting that GM2 could contribute to the accumulation of autolysosomes.

### **GM2 contributes to the accumulation of autolysosomes**

We evaluated the role of GM2 in the accumulation of autolysosomes using miglustat, a substrate reduction therapy (SRT) that inhibits glucosylceramide synthase, an early step in glycosphingolipid synthesis, which has been used to decrease GM2 levels in a model of Sandhoff disease (19). In our *in vitro* model, miglustat significantly decreased the levels of GM2 in a dose-dependent manner in control and *Spg11<sup>-/-</sup>* neurons (Fig. 4D). Miglustat (100  $\mu$ M) also strongly decreased the proportion of lysosomes positive for the p62 marker in *Spg11<sup>-/-</sup>* neurons (Fig. 4E). We more directly tested the role of ganglioside accumulation in the formation of autolysosomes using two independent miRNAs that target GM3 synthase, the enzyme producing the first ganglioside in the biosynthetic pathway, and from which all other sialylated gangliosides are generated (20). Expression of these miRNAs significantly decreased the expression of GM3 synthase mRNA and GM2 levels (Suppl. Fig. 3). When levels of GM2 were decreased after downregulation of GM3 synthase, the proportion of lysosomes containing p62 was significantly decreased in *Spg11<sup>-/-</sup>* neurons (Fig. 4F). Overall, our data suggest that the accumulation of GM2 in autolysosomes prevents the degradation of their content and their recycling.

We directly tested this hypothesis by downregulating the expression of neuraminidase 1 (Neu1), an enzyme involved in the degradation of gangliosides in lysosomes (21), in control cells. We used two independent miRNA sequences that efficiently downregulated Neu1 expression (Suppl. Fig. 4). Downregulation of Neu1 promoted significant accumulation of GM2 in lysosomes in transfected cells (Fig. 4 G and H). Increased GM2 levels in lysosomes, after downregulation of Neu1, resulted in a significant increase in the proportion of lysosomes positive for the autophagic marker p62 (Fig. 4I). This suggests that GM2 accumulation in lysosomes leads to the accumulation of autolysosomes.

## **GM2 promotes the accumulation of proteins required for early but not late steps of lysosome recycling**

We investigated whether the accumulation of GM2 in lysosomes impaired their function. Spatacsin has been proposed to play a role in the initiation of lysosomal membrane recycling (6). One of the proteins required for this cellular process is clathrin (4). We thus monitored the amount of clathrin that localized to lysosomes (Fig. 5A). The proportion of cellular clathrin colocalized with the lysosome marker Lamp1 was higher in *Spg11<sup>-/-</sup>* neurons than control cells. This proportion was much lower when GM2 levels in lysosomes were downregulated by miglustat treatment (Fig. 5B). Conversely, the amount of clathrin colocalized with lysosomes increased when GM2 levels in lysosomes were upregulated by transfection with miRNA targeting Neu1 (Fig. 5C). Altogether, these data suggest that GM2 promotes the accumulation of clathrin around lysosomes. We confirmed this data by quantifying the intensity of clathrin staining of lysosomes that were also either stained with the GM2 antibody, or not, in individual cells (Fig. 5A, D). We observed greater clathrin staining of lysosomes that were positive for GM2 in both control and *Spg11<sup>-/-</sup>* neurons (Fig. 5D). Accordingly, clathrin staining was high for large autofluorescent lysosomes that contain high amounts of GM2 (Fig. 1A) in the brains of *Spg11<sup>-/-</sup>* mice (Fig. 5E, F). Overall, these data suggest that GM2 accumulation in lysosomes leads to increased accumulation of clathrin surrounding lysosomes, which may be an indication of impaired lysosomal membrane recycling.

To confirm these data, the lysosome-enriched fractions obtained from *Spg11<sup>+/+</sup>* and *Spg11<sup>-/-</sup>* mouse brains and used for lipidomic analysis (Table 2) were separated on a Percoll gradient. The Lamp1 marker was shifted towards fractions of higher densities in the *Spg11<sup>-/-</sup>* derived fractions compared to wild-type. The high density lysosomal fractions isolated from *Spg11<sup>-/-</sup>* brains were also enriched in the autophagy marker p62, but also with clathrin and PIP5K1B that are required for initiation of lysosome recycling (4). We also looked for protein important for termination of the process such as dynamin (22). Dynamin-1 was highly enriched in the light density lysosomes obtained from *Spg11<sup>+/+</sup>* mouse brain, but it was strongly reduced in the high density autolysosomes derived from *Spg11<sup>-/-</sup>* mouse brains. Overall, these data suggest that ganglioside accumulation in lysosomes leads to increased accumulation of proteins required for initiation but not termination of the recycling of lysosomal membrane.

## **GM2 contributes to neurodegeneration in cultured neurons**

We then investigated whether accumulation of GM2 and autolysosomes contribute to neurodegeneration using primary cultures of mouse cortical neurons. We evaluated neuronal death triggered by glutamate, which occurs in many models of neurodegenerative diseases (23). Glutamate treatment has been shown to increase ganglioside levels in cultured neurons (24). Accordingly, we observed a moderate, but significant, increase in overall GM2 levels, both in control ( $+20.0 \pm 4.6\%$ ,  $p = 0.02$ , t-test,  $n > 9$ ) and *Spg11*<sup>-/-</sup> neurons ( $+15.7 \pm 3.9\%$   $p = 0.007$ , t-test,  $n > 10$ ).

Neuronal death triggered by glutamate was significantly higher in neurons obtained from *Spg11*<sup>-/-</sup> embryos than control neurons (Fig. 6A). Miglustat treatment of *Spg11*<sup>-/-</sup> neurons decreased glutamate-induced neuronal death in a dose-dependent manner (Fig. 6A). Similar data were obtained when GM2 levels were decreased after downregulation of GM3 synthase (Fig. 6B). These data suggest that GM2 accumulation contributes to neuronal death. We confirmed this hypothesis by inducing the accumulation of gangliosides in lysosomes, after downregulating Neu1, and monitoring neuronal death triggered by glutamate. Increasing ganglioside levels sensitized the neurons to glutamate-triggered cell death (Fig. 6C).

We monitored p62 levels in control and *Spg11*<sup>-/-</sup> neurons treated with glutamate for 24 hours to determine whether ganglioside-mediated autolysosome accumulation contributed to glutamate-induced neuronal death. We observed no difference in p62 levels in control neurons. In contrast, glutamate treatment significantly increased p62 levels in *Spg11*<sup>-/-</sup> neurons, which was inhibited when GM2 levels were decreased by miglustat treatment (Fig. 6D). These data suggest that GM2 contributes to neuronal death by promoting the accumulation of autolysosomes.

## Discussion

Normal functioning of lysosomes is required for neuronal viability and function. This is in part reflected by the presence of numerous neurological symptoms in lysosomal storage disorders (25). Mutations in many genes leading to neurodegenerative diseases are implicated in lysosomal function. In particular, two genes responsible for hereditary spastic paraplegias impair autophagic lysosome reformation in cultured cell lines (6). Here, we investigated a model of hereditary spastic paraplegia caused by mutations in the *SPG11* gene and showed that the accumulation of gangliosides in lysosomes disturbed lysosomal recycling, thus contributing to neurodegeneration.

The recycling of lysosomal membranes has been mainly investigated in cultured cell lines or fibroblasts, and little data are available in neuronal models. Loss of spatacsin leads to the accumulation of autolysosomes and the depletion of lysosomes in the brains of an *Spg11* knockout mouse model (11), but the molecular mechanisms underlying this phenomenon have not been entirely elucidated. Here, we used *Spg11*<sup>-/-</sup> neurons to show an increase in the number of autolysosomes, but whether this is caused by impaired autophagic lysosome recovery (ALR) is not clear. Indeed, ALR occurs after the induction of autophagy and leads to the formation of tubules extruding from autolysosomes (6). In neurons, we were unable to promote autophagy following starvation, as previously observed (26), and did not observe tubules extruding from lysosomes. Autolysosomes do not usually extrude lysosomal tubules under nutrient-rich conditions. Instead, lysosome reformation mainly occurs via vesiculation, mediated by PI4KB (1). Spatacsin has been shown to interact with this enzyme (6). Thus, we likely investigated the role of spatacsin on lysosomal membrane recycling by vesiculation in neurons.

Our data showed a strong accumulation of simple gangliosides (GM2, GM3, GD2, and GD3) in lysosomes in the cortex of *Spg11* knockout mice, which increased with age. The loss of spatacsin in embryonic models, such as human organoids or primary cultures of mouse cortical neurons, led to significantly increased levels of most of the simple gangliosides, except GD2, which was unaffected in brain organoids. This slight difference observed between models could be due changes in the nature of gangliosides that are synthesized in the brain during development (27). Our data therefore suggest that the loss of spatacsin impairs ganglioside metabolism and causes lysosomal dysfunction from early stages leading to the progressive accumulation of these lipids in lysosomes as the disease progresses. These accumulations represent the first biomarkers in this neurological condition.

We investigated their interest in therapeutic approaches by analyzing their implication in the function of lysosomes. We showed that the increase in the number of autolysosomes was mediated by the accumulation of gangliosides in these organelles in cultured *Spg11*<sup>-/-</sup> neurons. We prevented this *in vitro* using a pharmacological approach or RNA interference to decrease ganglioside biosynthesis, reducing GM2 levels. Gangliosides also accumulate in many lysosomal storage disorders, not only as direct outcomes of the primary genetic deficiency, as in Sandhoff, Tay-Sachs, and GM1 gangliosidosis, but also as secondary pathogenetic phenomena such as in the mucopolysaccharidoses or Niemann-Pick Type C diseases (28). Autophagy is impaired in most models of these diseases (29) and could be due to impaired lysosomal membrane recycling as a consequence of ganglioside accumulation in lysosomes.

The accumulation of autolysosomes in spatacsin-deficient cells has been proposed to be a consequence of the impaired initiation of lysosomal membrane recycling (6). Ganglioside accumulation in lysosomes could prevent the action of some proteins required for the initiation of lysosomal membrane recycling. Our data in cellular models and using biochemical fractionations suggested that autolysosomes containing high amount of gangliosides were enriched in proteins required for initiation of membrane recycling. Ganglioside accumulation in autolysosomes may block membrane recycling downstream of clathrin recruitment, as illustrated by the decreased recruitment of dynamin. Impaired vesicle fission and accumulation of clathrin-coated buds has been observed in cortical granules of oocytes in the *souffle* zebrafish mutant that has no spastizin, a spatacsin interactor implicated in lysosome membrane recycling (30). Expression of spastizin is strongly decreased in the brain of *Spg11*<sup>-/-</sup> mice (14), which could also contribute to impaired lysosomal membrane recycling.

We also show a progressive accumulation of simple gangliosides in lysosomes of neurons, which correlates with progression of neurodegeneration (14) and our *in vitro* data also suggest that the accumulation of gangliosides contributes to neurodegeneration. Neurons from *Spg11* knockout mice were more sensitive than control neurons to glutamate-induced cell death, a mechanism that has been proposed to play a role in many neurodegenerative diseases (23). We showed that glutamate treatment increased the cellular content of GM2 in control and *Spg11* knockout neurons, along with levels of the autophagic marker p62 in *Spg11* knockout neurons. High GM2 levels could contribute to impaired lysosomal membrane recycling in *Spg11*<sup>-/-</sup> neurons. This would exacerbate the accumulation of autolysosomes caused by glutamate treatment and explain the higher sensitivity of *Spg11*<sup>-/-</sup> neurons

to glutamate-induced toxicity than control neurons. A link between GM2 accumulation and neurodegeneration have also been observed in the spinster drosophila mutant that shows impaired ALR (7, 10, 31).

Decreasing GM2 levels in *Spg11*<sup>-/-</sup> neurons using two strategies reduced death caused by glutamate exposure, highlighting this pathway as a possible target for therapeutic intervention. One of the strategies consisted of using miglustat, a substrate reduction therapy that inhibits the synthesis of glycosphingolipids. Miglustat decreased GM2 levels and protected *Spg11*<sup>-/-</sup> neurons against glutamate toxicity *in vitro*. However, the therapeutic mechanism of action of miglustat *in vivo* is a matter of debate. Indeed, miglustat strongly decreased the levels of GM2 in liver in studies on mouse models of Sandhoff disease, but was less effective or completely ineffective in downregulating the levels of this lipid in the brain (19, 32). Miglustat is thus unlikely to be the best treatment for patients. However, the interest of decreasing ganglioside levels as a therapeutic strategy is demonstrated by our experiments targeting expression of GM3 synthase, the enzyme producing the first ganglioside in the biosynthetic pathway, and from which all other sialylated gangliosides are generated. Such treatment should be started at very early stages of the disease as we showed early accumulation of gangliosides in lysosomes, both in the *Spg11* knockout model and human SPG11 neurons. Our study supports inhibitors of ganglioside biosynthesis as candidate drugs to treat SPG11, if they could be active in the central nervous system.

Beside ganglioside accumulation, the levels of lysophospholipids and ceramide were decreased in the cortex of eight month-old *Spg11*<sup>-/-</sup> mice. These changes could reflect the neuronal death occurring at this stage, or contribute to neurodegeneration. Indeed, a decrease in ceramide synthesis has been shown to cause Purkinje cells neurodegeneration and lipofuscin accumulation (33) that were observed in two *Spg11* knockout mouse models (11, 14).

In conclusion, we show that loss of spatacsin function promotes early accumulation of gangliosides in lysosomes that contributes to accumulation of autolysosomes. Furthermore, elevated concentrations of gangliosides in lysosomes impair their recycling at early steps and sensitizes neurons to cell death. Spatacsin forms a protein complex with spastizin, mutated in SPG15 form of hereditary spastic paraplegia (HSP), and the AP-5 adaptor protein complex, a subunit of which is mutated in SPG48 form of HSP (34-36). SPG15 and SPG48 patient fibroblasts show abnormal lysosomal storage (37, 38). Lysosomes with abnormal morphology and accumulation of undigested

material were also observed in SPG4, SPG8 and SPG31 models of HSP (39). Thus, it might be informative to investigate ganglioside accumulation in these forms of HSP to better understand the physiopathological pathway leading to neuronal death and assess whether these patients can benefit from the same therapeutic approaches. In addition, gangliosides accumulate in lysosomes in many neurodegenerative diseases, not only lysosomal storage disorders with neurological symptoms (25), but also in models of more prevalent diseases, such as Alzheimer's disease (40). Our study, which identified gangliosides as biomarkers and key players in the accumulation of autolysosomes, thus has broad implications for understanding the pathways of neuronal death in neurodegenerative diseases since patients with various diseases could then benefit from the same therapeutic approaches.

## **Materials and Methods**

### **Ethical approval**

The care and treatment of animals followed European legislation (N° 2010/63/UE) and national (Ministère de l'Agriculture, France) guidelines for the detention, use, and ethical treatment of laboratory animals. All experiments on animals were approved by the local ethics committee (approval number A751319) and conducted by authorized personnel. Patient-derived materials were obtained through procedures approved by the ethics committee with the written, informed consent of the family (approval RBM-1-029).

### **Spg11-knockout mouse immunohistochemistry**

*Spg11*-knockout mice were described previously (14). Immunohistochemistry was performed as previously described (14). Images were obtained with an Olympus FV-1000 confocal microscope with a 60x objective (NA 1.35). The mean and the variance of fluorescence intensity of ganglioside immunostaining were determined for individual cells using ImageJ.

### **Cellular reprogramming, characterization, and differentiation of iPS cells**

Skin biopsies were collected from two healthy female subjects and two SPG11 female patients. Fibroblasts were reprogrammed into iPS cells by transient expression of OCT3/4, L-MYC, SOX2, KLF4, and LYN28 using episomal vectors as previously described (41). iPS cells were cultured on Geltrex matrix in complete E8 medium (Life technologies). We assessed the pluripotency of the iPS cells by differentiating them into embryoid bodies (EBs). iPSc clones were collected by collagenase treatment and resuspended in E8 medium without FGF2. Two weeks later, EBs were plated on polyornithine (20 µg/ml) and laminin (10 µg/ml)-coated cover slips and incubated for seven additional days. EBs were assessed for markers of the three germ layers: ectoderm (Nestin, Millipore), mesoderm ( $\alpha$ -smooth muscle actin, Abcam), and endoderm ( $\alpha$ -fetoprotein, Cell Signalling). iPS cells and EBS were also analyzed by real-time qPCR assays (TaqMan hPSC Scorecard Panel; Life Technologies) to confirm expression of pluripotency markers. iPS cells were differentiated into brain organoids following the protocol previously described (18). After 90 days *in vitro*, organoids were fixed in 4% paraformaldehyde for 24 h, cryoconserved, and stored at -80°C. Organoid slices (12 µm) were

cut on a cryostat (LEICA\_CM3050S) and processed for immunostaining as described for the mouse brain slices. Images were obtained using a Leica SP-8 confocal microscope with a 60x objective (NA 1.4). Quantification of ganglioside accumulation was performed as for the mouse brain sections.

### **Lipidomic analysis**

The cerebral cortices of six-week-old *Spg11<sup>-/-</sup>* and *Spg11<sup>+/+</sup>* mice were processed and analyzed as described previously (42). After liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry analysis, samples were re-injected for higher energy collisional dissociation (HCD) tandem mass spectrometry experiments (MS/MS) in the negative ion mode, with the instrument set in the targeted mode, using inclusion lists. The isolation width was set to  $m/z$  0.4, the normalized collision energy was 26%, and mass resolution was set to 17,500 FWHM at  $m/z$  200. HCD mass spectra were inspected manually to confirm the identity of the ganglioside species. The relative amount of each lipid was quantified as the area of its chromatographic peak, and it was normalized to the exact weight of each cortex.

### **Lysosome fractions**

Lysosome-enriched fractions were purified from whole brains of eight-month old animals following the self-generated Percoll gradient protocol described previously (43) (Suppl. Fig 1A). At the end of the protocol, the lysosome-enriched fractions were washed once in PBS and the protein quantified by the BCA kit (Pierce). Western blots were performed as described previously (44). Lysosome-enriched fractions were extracted according to the Folch procedure (45). The desalted Folch upper phases (aqueous phases), containing gangliosides, were analyzed by liquid chromatography coupled with high resolution mass spectrometry (LC-HRMS) in the negative ionization mode to detect deprotonated singly  $[M-H]^-$  and doubly charged ions  $[M-2H]^{2-}$ . Data was treated and analyzed as described previously (42). The relative amount of each lipid was quantified as the area of its chromatographic peak, and it was normalized to the concentration of proteins in each lysosome-enriched fraction.

The lysosome fractions were further separated using self-generated Percoll gradients. Lysosome fractions were mixed with Percoll to get a solution of 50% Percoll (v:v) and centrifuged at 20,000g for 90 min. Eight fractions of equal volume were collected from the top, and were analyzed by western blot.

## Antibodies

Antibodies used in the study were: rat anti-Lamp1 (Clone 1D4B), mouse anti-Lamp1 (clone H5G11; Santa Cruz Biotechnologies), mouse anti-GRP78 (BD Biosciences), mouse anti-p62 (Abcam), mouse-anti-clathrin (clone X-22, Abcam; clone 23, BD Biosciences), rabbit anti-Pax-6 (Covance), mouse anti- $\beta$ III-tubulin (Tuj1; Eurogentec), rabbit anti-sox2 (Millipore), mouse anti-oct4 (Santa Cruz biotechnology), mouse anti-Tra1-60 (Millipore), mouse anti-GM2 (hybridoma supernatant produced in-house) (46, 47), mouse anti-GM3 (Cosmo Bio), mouse anti-GD2 (Millipore), and mouse anti-GD3 (Invitrogen), rabbit anti-PIP5K1B (Proteintech), rabbit anti-dynamin1 (Abcam). For immunoblotting, the secondary antibodies were conjugated to fluorochromes (IR-dye 800 or IR-dye 680; LI-COR). Secondary antibodies used for immunofluorescence were purchased from Life Technologies.

## Primary culture of neurons

Mouse primary cultures of cortical neurons were prepared as described (14). When needed, neurons were treated with miglustat (Tocris) from the second day in culture. Media was changed every three days. Vectors expressing two different miRNAs to downregulate GM3 synthase (GM3S) and Neu1 expression were produced using the Block-it kit (Life Technologies). The miRNA sequences were: ATGTACAGGAGCCAGACTCCAGTTTTGGCCACTGACTGACTGGAGTCTCTCCTGTACAT (miRNA GM3S-1), ATAACAGAGCCATAGCCGTCTGTTTTGGCCACTGACTGACAGACGGCTGGCTCTGTTAT (miRNA GM3S-2), TCTACAGAGCCGATCTGCTTCGTTTTGGCCACTGACTGACGAAGCAGAGGCTCTGTAGA (miRNA Neu1-1) and CTACGATGAAGGCTGTAGAGGGTTTTGGCCACTGACTGACCCTCTACACTTCATCGTAG (miRNA Neu1-2). Neurons were transfected with vectors expressing the miRNA and GFP using the Neon transfection system (Life Technologies) with the following parameters: 1500V, 10ms, and 3 pulses. The efficiency of the miRNA sequences was validated by transfecting NIH-3T3 cells and performing quantitative RT-PCR using a LightCycler 480 apparatus (Roche) following the manufacturer's instructions. Immunostaining was performed after six days of culture *in vitro*, as previously described (48), and images acquired using an Apotome2 microscope (Zeiss) with an objective Plan-Apochromat 63x (N.A. 1.4), or an with Olympus FV-1000 confocal microscope. Ganglioside levels were quantified

as the mean grey value using ImageJ. Colocalization of ganglioside staining with lysosomes was quantified using ImageJ. A mask was made from the Lamp1 staining channel and the corresponding ganglioside fluorescence was quantified as the percentage of total ganglioside fluorescence in every cell. A similar method was used to quantify the amount of clathrin colocalized with lysosomes. Neuronal death was induced by the addition of 200  $\mu$ M glutamate (Sigma-Aldrich) in culture medium. Thirty hours after glutamate treatment, neurons were fixed in 4% paraformaldehyde and immunostained with Tuj-1 antibody. The number of Tuj-1-positive cells per well was quantified with an automated ArrayScan XTI apparatus (Thermo-Fisher) using the compartmental analysis protocol. Neuronal death was quantified by comparing glutamate-treated and non-treated neurons.

### **Statistics**

Statistics were performed using GraphPad Prism software, using the tests indicated in the figure legends. The data on graphs represent the mean  $\pm$  SEM. A *P* value of 0.05 or less was considered to be statistically significant. For lipidomic analysis, the *mcp* package was used with R version 3.0.2. Comparison of the means between phenotypes was performed using a t-test with a Benjamini-Hochberg procedure to correct for multiple testing, with a false discovery rate of 5%.

## **Acknowledgments**

We thank Phenoparc, Histomics, IGenSeq, Celis, and the Imaging Center of the ICM for their contributions. The 1D4B monoclonal antibody was obtained from the Developmental Studies Hybridoma Bank (University of Iowa, Department of Biology, IA 52242). This work was supported by the “Investissements d’Avenir” program [ANR-10-IAIHU-06] and [ANR-11-INBS-0011] grants and received funding from the Verum Foundation (to A.B. and G.S.), the French Agency for Research (ANR) (13-ISV1-00002 to G.S. and MetaboHUB: ANR-11-INBS-0010), the *GIS-Maladies Rares* Foundation (to G.S.), the *Fondation Roger de Spoelberch* (to A.B.), and the European Union with the ANR (to A.B., Seventh Framework Programme - FP7, Omics call [grant No 305121]; to G.S., the E-Rare programme Neurolipid [ANR-13-ERARE-0003-02]) and the European Research Council (European Research Council Starting [grant No 311149] to F.D.). M.B. received a fellowship from the French Ministry of Research (doctoral school ED3C).

## **Conflict of Interest Statement**

The authors have no conflict of interest to declare.

## **Author Contributions.**

Conceived and designed the experiments: MB, JB, AB, FM, KHEH, GS, and FD

Performed the experiments: MB, JB, CL, JP, RM, AS, MP, BC, AP, KD, AD, KHEH, and FD

Analyzed the data: MB, JB, CL, JP, RM, AS, MP, BC, FM, KHEH, and FD

Wrote the paper: MB, JB, GS, and FD

## References

1. Sridhar, S., Patel, B., Aphkhasava, D., Macian, F., Santambrogio, L., Shields, D., and Cuervo, A.M. 2013. The lipid kinase PI4KIIIbeta preserves lysosomal identity. *EMBO J* 32:324-339.
2. Yu, L., McPhee, C.K., Zheng, L., Mardones, G.A., Rong, Y., Peng, J., Mi, N., Zhao, Y., Liu, Z., Wan, F., et al. 2010. Termination of autophagy and reformation of lysosomes regulated by mTOR. *Nature* 465:942-946.
3. Du, W., Su, Q.P., Chen, Y., Zhu, Y., Jiang, D., Rong, Y., Zhang, S., Zhang, Y., Ren, H., Zhang, C., et al. 2016. Kinesin 1 Drives Autolysosome Tubulation. *Dev Cell* 37:326-336.
4. Rong, Y., Liu, M., Ma, L., Du, W., Zhang, H., Tian, Y., Cao, Z., Li, Y., Ren, H., Zhang, C., et al. 2012. Clathrin and phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate regulate autophagic lysosome reformation. *Nat Cell Biol* 14:924-934.
5. Magalhaes, J., Gegg, M.E., Migdalska-Richards, A., Doherty, M.K., Whitfield, P.D., and Schapira, A.H. 2016. Autophagic lysosome reformation dysfunction in glucocerebrosidase deficient cells: relevance to Parkinson disease. *Hum Mol Genet* 25:3432-3445.
6. Chang, J., Lee, S., and Blackstone, C. 2014. Spastic paraplegia proteins spastizin and spatascin mediate autophagic lysosome reformation. *J Clin Invest* 124:5249-5262.
7. Rong, Y., McPhee, C.K., Deng, S., Huang, L., Chen, L., Liu, M., Tracy, K., Baehrecke, E.H., Yu, L., and Lenardo, M.J. 2011. Spinster is required for autophagic lysosome reformation and mTOR reactivation following starvation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:7826-7831.
8. Tesson, C., Koht, J., and Stevanin, G. 2015. Delving into the complexity of hereditary spastic paraplegias: how unexpected phenotypes and inheritance modes are revolutionizing their nosology. *Hum Genet* 134:511-538.
9. Stirnemann, J., Belmatoug, N., Camou, F., Serratrice, C., Froissart, R., Caillaud, C., Levade, T., Astudillo, L., Serratrice, J., Brassier, A., et al. 2017. A Review of Gaucher Disease Pathophysiology, Clinical Presentation and Treatments. *Int J Mol Sci* 18.
10. Nakano, Y., Fujitani, K., Kurihara, J., Ragan, J., Usui-Aoki, K., Shimoda, L., Lukacsovich, T., Suzuki, K., Sezaki, M., Sano, Y., et al. 2001. Mutations in the novel membrane protein spinster interfere with programmed cell death and cause neural degeneration in *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Biol* 21:3775-3788.
11. Varga, R.E., Khundadze, M., Damme, M., Nietzsche, S., Hoffmann, B., Stauber, T., Koch, N., Hennings, J.C., Franzka, P., Huebner, A.K., et al. 2015. In Vivo Evidence for Lysosome Depletion and Impaired Autophagic Clearance in Hereditary Spastic Paraplegia Type SPG11. *PLoS Genet* 11:e1005454.
12. Robinson, M.S. 2015. Forty Years of Clathrin-coated Vesicles. *Traffic* 16:1210-1238.
13. Dermaut, B., Norga, K.K., Kania, A., Verstreken, P., Pan, H., Zhou, Y., Callaerts, P., and Bellen, H.J. 2005. Aberrant lysosomal carbohydrate storage accompanies endocytic defects and neurodegeneration in *Drosophila benchwarmer*. *J Cell Biol* 170:127-139.
14. Branchu, J., Boutry, M., Sourd, L., Depp, M., Leone, C., Corriger, A., Vallucci, M., Esteves, T., Matusiak, R., Dumont, M., et al. 2017. Loss of spatascin function alters lysosomal lipid clearance leading to upper and lower motor neuron degeneration. *Neurobiol Dis* 102:21-37.
15. Stevanin, G., Santorelli, F.M., Azzedine, H., Coutinho, P., Chomilier, J., Denora, P.S., Martin, E., Ouvrard-Hernandez, A.M., Tessa, A., Bouslam, N., et al. 2007. Mutations in SPG11, encoding spatascin, are a major cause of spastic paraplegia with thin corpus callosum. *Nat Genet* 39:366-372.
16. Hehr, U., Bauer, P., Winner, B., Schule, R., Olmez, A., Koehler, W., Uyanik, G., Engel, A., Lenz, D., Seibel, A., et al. 2007. Long-term course and mutational spectrum of spatascin-linked spastic paraplegia. *Ann Neurol* 62:656-665.

17. Paisan-Ruiz, C., Dogu, O., Yilmaz, A., Houlden, H., and Singleton, A. 2008. SPG11 mutations are common in familial cases of complicated hereditary spastic paraplegia. *Neurology* 70:1384-1389.
18. Pasca, A.M., Sloan, S.A., Clarke, L.E., Tian, Y., Makinson, C.D., Huber, N., Kim, C.H., Park, J.Y., O'Rourke, N.A., Nguyen, K.D., et al. 2015. Functional cortical neurons and astrocytes from human pluripotent stem cells in 3D culture. *Nat Methods* 12:671-678.
19. Jeyakumar, M., Butters, T.D., Cortina-Borja, M., Hunnam, V., Proia, R.L., Perry, V.H., Dwek, R.A., and Platt, F.M. 1999. Delayed symptom onset and increased life expectancy in Sandhoff disease mice treated with N-butyldeoxynojirimycin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:6388-6393.
20. Xu, Y.H., Barnes, S., Sun, Y., and Grabowski, G.A. 2010. Multi-system disorders of glycosphingolipid and ganglioside metabolism. *J Lipid Res* 51:1643-1675.
21. Bonten, E., van der Spoel, A., Fornerod, M., Grosveld, G., and d'Azzo, A. 1996. Characterization of human lysosomal neuraminidase defines the molecular basis of the metabolic storage disorder sialidosis. *Genes Dev* 10:3156-3169.
22. Schulze, R.J., Weller, S.G., Schroeder, B., Krueger, E.W., Chi, S., Casey, C.A., and McNiven, M.A. 2013. Lipid droplet breakdown requires dynamin 2 for vesiculation of autolysosomal tubules in hepatocytes. *J Cell Biol* 203:315-326.
23. Lewerenz, J., and Maher, P. 2015. Chronic Glutamate Toxicity in Neurodegenerative Diseases-What is the Evidence? *Front Neurosci* 9:469.
24. Park, D.H., Wang, L., Pittock, P., Lajoie, G., and Whitehead, S.N. 2016. Increased Expression of GM1 Detected by Electrospray Mass Spectrometry in Rat Primary Embryonic Cortical Neurons Exposed to Glutamate Toxicity. *Anal Chem* 88:7844-7852.
25. Onyenwoke, R.U., and Brenman, J.E. 2015. Lysosomal Storage Diseases-Regulating Neurodegeneration. *J Exp Neurosci* 9:81-91.
26. Mizushima, N., Yamamoto, A., Matsui, M., Yoshimori, T., and Ohsumi, Y. 2004. In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Mol Biol Cell* 15:1101-1111.
27. Yu, R.K., Nakatani, Y., and Yanagisawa, M. 2009. The role of glycosphingolipid metabolism in the developing brain. *J Lipid Res* 50 Suppl:S440-445.
28. Walkley, S.U., and Vanier, M.T. 2009. Secondary lipid accumulation in lysosomal disease. *Biochim Biophys Acta* 1793:726-736.
29. Menzies, F.M., Fleming, A., and Rubinsztein, D.C. 2015. Compromised autophagy and neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci* 16:345-357.
30. Kanagaraj, P., Gautier-Stein, A., Riedel, D., Schomburg, C., Cerda, J., Vollack, N., and Dosch, R. 2014. Souffle/Spastizin controls secretory vesicle maturation during zebrafish oogenesis. *PLoS Genet* 10:e1004449.
31. Usui-Aoki, K., Nakano, Y., and Yamamoto, D. 2002. Pathology of the adult central nervous system induced by genetic inhibition of programmed cell death in *Drosophila* pupae. *Arch Insect Biochem Physiol* 49:94-101.
32. Ashe, K.M., Bangari, D., Li, L., Cabrera-Salazar, M.A., Bercury, S.D., Nietupski, J.B., Cooper, C.G., Aerts, J.M., Lee, E.R., Copeland, D.P., et al. 2011. Iminosugar-based inhibitors of glucosylceramide synthase increase brain glycosphingolipids and survival in a mouse model of Sandhoff disease. *PLoS One* 6:e21758.
33. Zhao, L., Spassieva, S.D., Jucius, T.J., Shultz, L.D., Shick, H.E., Macklin, W.B., Hannun, Y.A., Obeid, L.M., and Ackerman, S.L. 2011. A deficiency of ceramide biosynthesis causes cerebellar purkinje cell neurodegeneration and lipofuscin accumulation. *PLoS Genet* 7:e1002063.
34. Hanein, S., Martin, E., Boukhris, A., Byrne, P., Goizet, C., Hamri, A., Benomar, A., Lossos, A., Denora, P., Fernandez, J., et al. 2008. Identification of the SPG15 gene, encoding spastizin, as a frequent cause of complicated autosomal-recessive spastic paraplegia, including Kjellin syndrome. *Am J Hum Genet* 82:992-1002.

35. Hirst, J., D. Barlow, L., Francisco, G.C., Sahlender, D.A., Seaman, M.N.J., Dacks, J.B., and Robinson, M.S. 2011. The Fifth Adaptor Protein Complex. *PLoS Biol* 9:e1001170.
36. Slabicki, M., Theis, M., Krastev, D.B., Samsonov, S., Mundwiller, E., Junqueira, M., Paszkowski-Rogacz, M., Teyra, J., Heninger, A.K., Poser, I., et al. 2010. A genome-scale DNA repair RNAi screen identifies SPG48 as a novel gene associated with hereditary spastic paraplegia. *PLoS Biol* 8:e1000408.
37. Renvoise, B., Chang, J., Singh, R., Yonekawa, S., FitzGibbon, E.J., Mankodi, A., Vanderver, A., Schindler, A., Toro, C., Gahl, W.A., et al. 2014. Lysosomal abnormalities in hereditary spastic paraplegia types SPG15 and SPG11. *Ann Clin Transl Neurol* 1:379-389.
38. Hirst, J., Edgar, J.R., Esteves, T., Darios, F., Madeo, M., Chang, J., Roda, R.H., Durr, A., Anheim, M., Gellera, C., et al. 2015. Loss of AP-5 Results in Accumulation of Aberrant Endolysosomes, Defining a New Type of Lysosomal Storage Disease. *Hum Mol Genet*.
39. Allison, R., Edgar, J.R., Pearson, G., Rizo, T., Newton, T., Gunther, S., Berner, F., Hague, J., Connell, J.W., Winkler, J., et al. 2017. Defects in ER-endosome contacts impact lysosome function in hereditary spastic paraplegia. *J Cell Biol* 216:1337-1355.
40. Yang, D.S., Stavrides, P., Saito, M., Kumar, A., Rodriguez-Navarro, J.A., Pawlik, M., Huo, C., Walkley, S.U., Cuervo, A.M., and Nixon, R.A. 2014. Defective macroautophagic turnover of brain lipids in the TgCRND8 Alzheimer mouse model: prevention by correcting lysosomal proteolytic deficits. *Brain* 137:3300-3318.
41. Okita, K., Matsumura, Y., Sato, Y., Okada, A., Morizane, A., Okamoto, S., Hong, H., Nakagawa, M., Tanabe, K., Tezuka, K., et al. 2011. A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. *Nat Methods* 8:409-412.
42. Seyer, A., Boudah, S., Broudin, S., Junot, C., and Colsch, B. 2016. Annotation of the human cerebrospinal fluid lipidome using high resolution mass spectrometry and a dedicated data processing workflow. *Metabolomics* 12:91.
43. Graham, J.M. 2001. Isolation of lysosomes from tissues and cells by differential and density gradient centrifugation. *Curr Protoc Cell Biol* Chapter 3:Unit 3 6.
44. Esteves, T., Durr, A., Mundwiller, E., Loureiro, J.L., Boutry, M., Gonzalez, M.A., Gauthier, J., El-Hachimi, K.H., Depienne, C., Muriel, M.P., et al. 2014. Loss of association of REEP2 with membranes leads to hereditary spastic paraplegia. *Am J Hum Genet* 94:268-277.
45. Folch, J., Lees, M., and Sloane Stanley, G.H. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 226:497-509.
46. Natoli, E.J., Jr., Livingston, P.O., Pukel, C.S., Lloyd, K.O., Wiegandt, H., Szalay, J., Oettgen, H.F., and Old, L.J. 1986. A murine monoclonal antibody detecting N-acetyl- and N-glycolyl-GM2: characterization of cell surface reactivity. *Cancer Res* 46:4116-4120.
47. Dobrenis, K., Joseph, A., and Rattazzi, M.C. 1992. Neuronal lysosomal enzyme replacement using fragment C of tetanus toxin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:2297-2301.
48. Murmu, R.P., Martin, E., Rastetter, A., Esteves, T., Muriel, M.P., El Hachimi, K.H., Denora, P.S., Dauphin, A., Fernandez, J.C., Duyckaerts, C., et al. 2011. Cellular distribution and subcellular localization of spatascin and spastizin, two proteins involved in hereditary spastic paraplegia. *Mol Cell Neurosci* 47:191-202.

## Legends to Figures

**Figure 1.** Spatacsin loss promotes lysosomal accumulation of gangliosides in neurons of the cortex.

A. GM2 (green) and Lamp1 (magenta) immunostaining of *Spg11<sup>+/+</sup>* and *Spg11<sup>-/-</sup>* cortical motor neurons from six-week-old and eight-month-old animals. Confocal microscopy images showing the accumulation of GM2-positive staining in lysosomes surrounded by Lamp1 staining in six-week-old and eight-month-old *Spg11<sup>-/-</sup>* animals. Insets show the view along the z-axis. Scale bars: 10  $\mu\text{m}$ .

B-E. Quantification of the mean (left panel) and variance (right panel) of the GM2 (B), GM3 (C), GD2 (D), and GD3 (E) immunostaining intensity per neuron. The graphs show the mean  $\pm$  SEM values.  $N > 10$  neurons quantified in five independent cortex slices. Kruskal-Wallis test; \*\*\*:  $p \leq 0.0001$ .

**Figure 2.** Spatacsin loss promotes lysosomal accumulation of gangliosides in neurons derived from SPG11 patients.

A. Immunostaining of brain organoids differentiated for 90 days *in vitro* with antibody against the progenitor marker Pax6 and the neuron-specific marker  $\beta$ III-tubulin. Note that neuronal cells are concentrated at the periphery of the organoids. Scale bar: 50 $\mu\text{m}$ .

B. GM2 (green) and Lamp1 (magenta) immunostaining in the neuronal layer of organoids derived from healthy subjects or SPG11 patients.  $\beta$ III-tubulin shows the neuronal identity of the cells that were analyzed. Confocal microscopy images showing the accumulation of GM2-positive staining in lysosomes labelled by Lamp1 staining of organoids derived from SPG11 patients (arrowheads). Scale bar: 10  $\mu\text{m}$ .

C-F. Quantification of the mean (left panel) and variance (right panel) of the GM2 (C), GM3 (D), GD2 (E), and GD3 (F) immunostaining intensity per neuron. The graph shows mean  $\pm$  SEM values.  $N > 10$  neurons quantified in five independent cortex slices. One-way ANOVA; \*\*\* $p \leq 0.001$ .

**Figure 3.** Spatacsin loss induces lysosomal accumulation of gangliosides in primary cultures of cortical neurons.

- A. GM2 (green) and Lamp1 (magenta) immunostaining of *Spg11<sup>+/+</sup>* and *Spg11<sup>-/-</sup>* neurons cultured for six days *in vitro*. Confocal microscopy images showing the accumulation of GM2-positive staining of lysosomes labeled by Lamp1 staining. Scale bar: 10  $\mu$ m.
- B-E. Quantification of the proportion of GM2 (B), GM3 (C), GD2 (D), and GD3 (E) staining that is localized in lysosomes. The graphs show the mean  $\pm$  SEM values.  $N > 50$  neurons quantified in three independent neuron preparations. T-test; \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$ .

**Figure 4.** GM2 accumulation in lysosomes promotes the formation of autolysosomes.

- A. Proportion of lysosomes stained with Lamp1 that were also positive for p62 in *Spg11<sup>+/+</sup>* and *Spg11<sup>-/-</sup>* neurons after three and six days *in vitro*. The graph shows the mean  $\pm$  SEM values.  $N > 50$  neurons quantified in at least four independent neuron preparations. Two-way ANOVA; \* $p = 0.04$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .
- B. Immunostaining of *Spg11<sup>-/-</sup>* neurons with GM2 antibody (cyan), lysosomal marker Lamp1 (magenta), and the autophagy marker p62 (yellow). Arrowheads indicate autolysosomes, which were positive for GM2 staining. Scale bar: 10 $\mu$ m.
- C. Proportion of lysosomes stained with Lamp1 that were also positive for both p62 and GM2 in *Spg11<sup>+/+</sup>* and *Spg11<sup>-/-</sup>* neurons after three and six days *in vitro*. The graph shows the mean  $\pm$  SEM values.  $N > 50$  neurons quantified in at least four independent neuron preparations. Two-way ANOVA; \*\*\* $p < 0.001$ .
- D. Quantification of the fluorescence intensity of GM2 immunostaining of primary cultures of *Spg11<sup>+/+</sup>* and *Spg11<sup>-/-</sup>* cortical neurons cultured for six days *in vitro* with various concentrations of miglustat. The graph shows the mean  $\pm$  SEM values.  $N > 3$  measurements with at least 200 neurons quantified in each experiment.
- E. Effect of miglustat treatment (100  $\mu$ M) on the proportion of lysosomes stained with Lamp1 that were also positive for p62 in *Spg11<sup>+/+</sup>* and *Spg11<sup>-/-</sup>* neurons after six days *in vitro*. The graph shows the mean  $\pm$  SEM values.  $N > 50$  neurons quantified in at least four independent neuron preparations. Two-way ANOVA; \*\*\* $p < 0.001$ .
- F. Effect of the downregulation of GM3 synthase with two independent miRNAs (GM3S-1 and GM3S-2) on the proportion of lysosomes stained with Lamp1 that were also positive for p62 in control neurons after six days *in vitro*. The graph shows the mean  $\pm$  SEM values.  $N > 20$

neurons quantified in at least three independent neuron preparations. Two-way ANOVA; \*\*\* $p < 0.001$ .

- G. Effect of Neu1 downregulation on staining with antibodies directed against GM2 (cyan) and Lamp1 (magenta). Note the increase in the number of lysosomes labeled with GM2 after downregulation of Neu1. Scale Bar: 10 $\mu$ m.
- H. Quantification of the proportion of GM2 staining that is localized to lysosomes in neurons transfected with vectors expressing two independent miRNAs directed against Neu1. The graph shows the mean  $\pm$  SEM values.  $N > 20$  neurons quantified in three independent neuron preparations. One-way ANOVA; \* $p = 0.02$ ; \*\* $p = 0.0017$ .
- I. Effect of Neu1 downregulation with two independent miRNAs (Neu1-1 and Neu1-2) on the proportion of lysosomes stained with Lamp1 that were also positive for p62 in control neurons after six days *in vitro*. The graph shows the mean  $\pm$  SEM values.  $N > 20$  neurons quantified in three independent neuron preparations. One-way ANOVA; \*\*\* $p < 0.001$ .

**Figure 5:** GM2 promotes the recruitment of clathrin to lysosomes.

- A. Immunostaining of *Spg11*<sup>-/-</sup> neurons with Lamp1 (cyan), GM2 (yellow), and clathrin (magenta) antibodies. Arrowheads point to lysosomes positive for the GM2 marker that show recruitment of clathrin. Scale bar: 10 $\mu$ m.
- B. Effect of miglustat treatment (100  $\mu$ M) on the amount of clathrin colocalized with the lysosome marker Lamp1 in *Spg11*<sup>+/+</sup> and *Spg11*<sup>-/-</sup> neurons after six days *in vitro*. The graph shows the mean  $\pm$  SEM values.  $N > 50$  neurons quantified in at least three independent neuron preparations. Two-way ANOVA; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .
- C. Effect of Neu1 downregulation with two independent miRNAs (Neu1-1 and Neu1-2) on the amount of clathrin colocalized with the lysosome marker Lamp1 in control neurons after six days *in vitro*. The graph shows the mean  $\pm$  SEM values.  $N > 20$  neurons quantified in at least three independent neuron preparations. One-way ANOVA; \*\* $p = 0.0014$ .
- D. Intensity of clathrin staining colocalized with all lysosomes and lysosomes stained with GM2, in *Spg11*<sup>+/+</sup> and *Spg11*<sup>-/-</sup> neurons after six days *in vitro*. The graph shows the mean  $\pm$  SEM values.  $N > 50$  neurons quantified in five independent neuron preparations. Two-way ANOVA; \*\*\* $p < 0.001$ .

E-F. Confocal microscopy images of autofluorescence (green), Lamp1 (magenta) and clathrin (cyan) immunostaining of *Spg11<sup>+/+</sup>* and *Spg11<sup>-/-</sup>* cortical motor neurons from six-week-old (E) and eight-month-old animals (F) showing the accumulation of clathrin surrounding autofluorescent lysosomes. Scale bars: 10  $\mu$ m.

G. Western blot analysis of lysosome fractions obtained from 8 month-old *Spg11<sup>+/+</sup>* and *Spg11<sup>-/-</sup>* mouse brains separated on a density gradient. Note the increase in Lamp1-positive compartment with higher density in *Spg11<sup>-/-</sup>* mouse brains. This compartment also had higher amount of p62, clathrin and PIP5K1B, but not dynamin1.

**Figure 6:** Treatments modulating GM2 levels modulate neuronal death triggered by glutamate.

- A. Quantification of neuronal death 30 hours after incubation of neurons with glutamate (200  $\mu$ M) in primary cultures of *Spg11<sup>+/+</sup>* or *Spg11<sup>-/-</sup>* cortical neurons treated with miglustat. The graph shows the mean  $\pm$  SEM values.  $N > 5$  independent experiments. One-way ANOVA; \* $p = 0.02$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .
- B. Quantification of neuronal death 30 hours after incubation of neurons with glutamate (200  $\mu$ M) in primary cultures of *Spg11<sup>+/+</sup>* and *Spg11<sup>-/-</sup>* cortical neurons transfected with vectors expressing control miRNA or two different miRNAs against GM3 synthase.  $N > 3$  independent experiments with at least 100 neurons quantified in each experiment. One-way ANOVA; \* $p < 0.02$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .
- C. Quantification of neuronal death 30 hours after incubation of neurons with glutamate (200  $\mu$ M) in primary cultures of *Spg11<sup>+/+</sup>* and *Spg11<sup>-/-</sup>* cortical neurons transfected with vectors that downregulate Neu1 with two independent miRNAs (Neu1-1 and Neu1-2). The graph shows the mean  $\pm$  SEM values.  $N > 3$  independent experiments. One-way ANOVA; \* $p = 0.016$ ; \*\* $p = 0.003$ .
- D. Western blot analysis of p62 levels in *Spg11<sup>+/+</sup>* and *Spg11<sup>-/-</sup>* cortical neurons treated or not with miglustat (100  $\mu$ M). Neurons were incubated with glutamate (200  $\mu$ M) for 24 hours. Graph showing the quantification of the relative amount of p62 normalized to tubulin in *Spg11<sup>+/+</sup>* and *Spg11<sup>-/-</sup>* cortical neurons treated with miglustat or glutamate.  $N > 5$  independent experiments. One-way ANOVA; \*\* $p < 0.01$ .

**Table 1:** Relative amounts of various classes of lipids in the cortex of eight-month-old *Spg11<sup>+/+</sup>* and *Spg11<sup>-/-</sup>* mice. Arbitrary units.

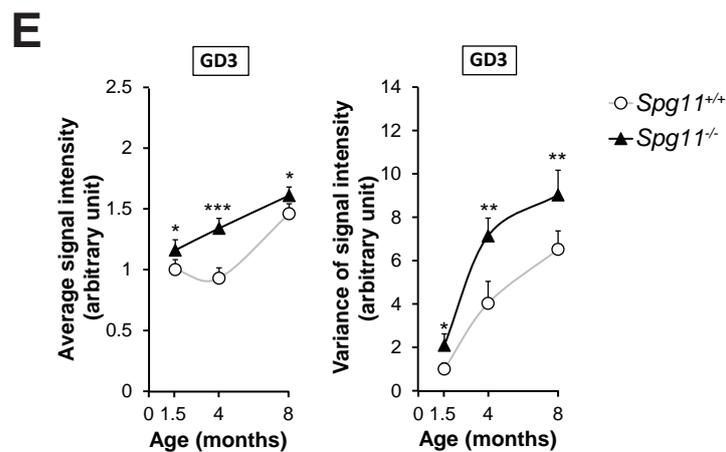
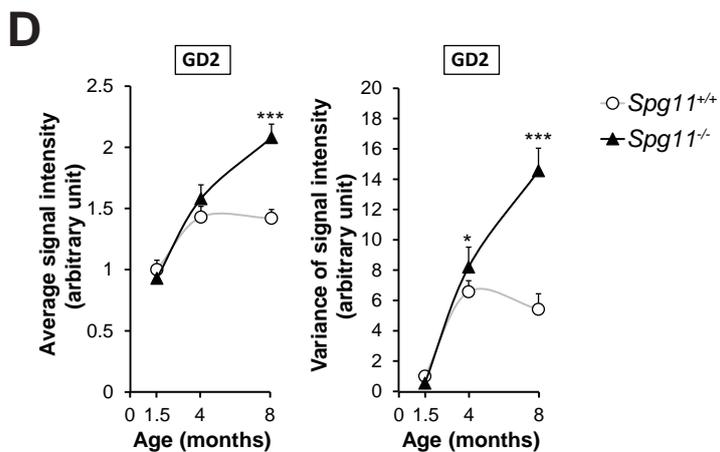
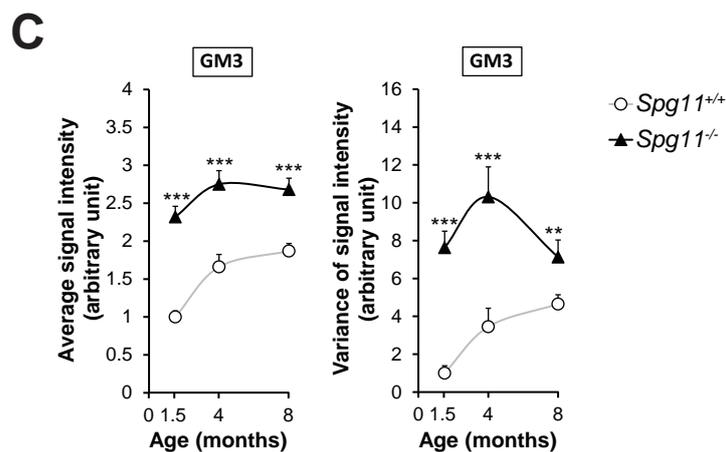
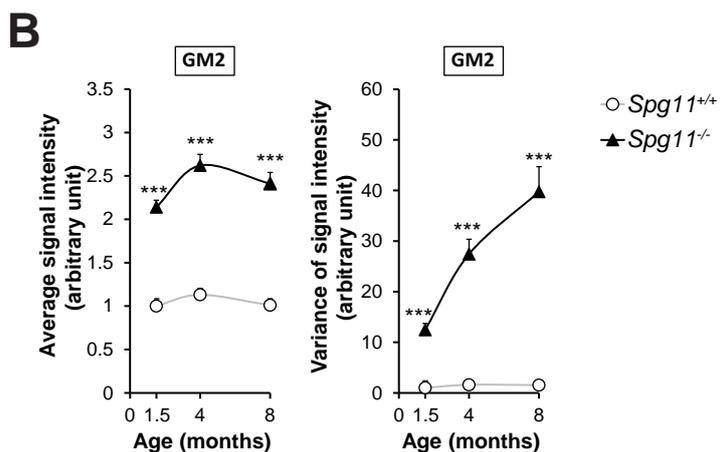
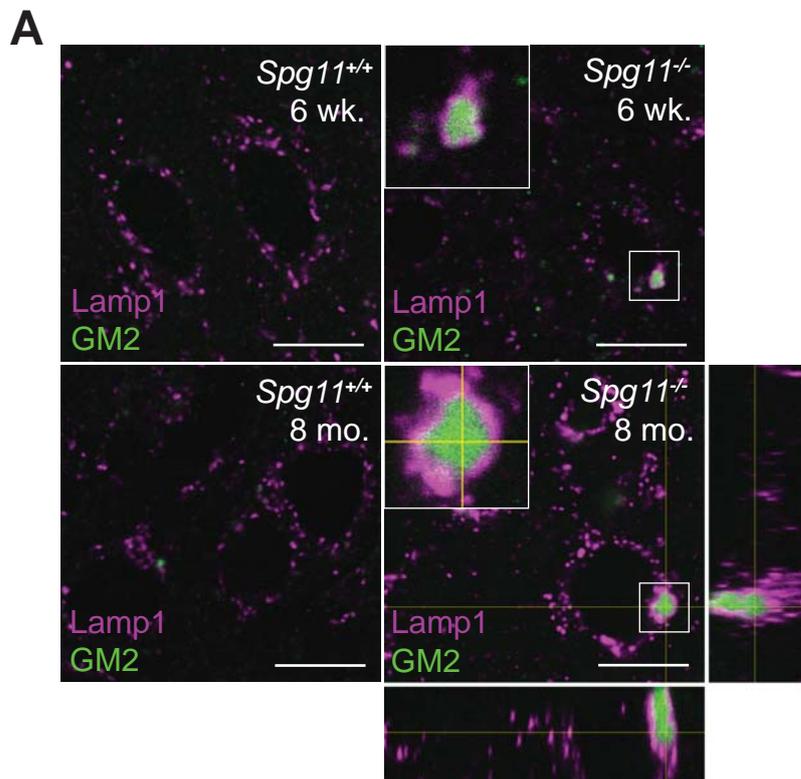
\*p < 0.05, T-test with Benjamini-Hochberg procedure to correct for multiple testing (n = 8). Significant differences are highlighted in bold.

	<i>Spg11<sup>+/+</sup></i>	<i>Spg11<sup>-/-</sup></i>	Fold change
<b>Fatty Acyls</b>			
<b>Total Free fatty acids (FA)</b>	<b>87.31 ± 5.12</b>	<b>61.74 ± 4.54*</b>	<b>0.71</b>
<b>Glycerolipids</b>			
Total Diacylglycerols (DG)	25.44 ± 2.31	23.68 ± 2.04	0.93
Total Triacylglycerols (TG)	39.92 ± 3.79	33.13 ± 4.22	0.83
Total Cardiolipines (CL)	11.01 ± 0.92	10.39 ± 0.61	0.94
<b>Glycerophospholipids</b>			
<b>Total Lyso-Glycerophosphocholines (LPC)</b>	<b>60.62 ± 4.32</b>	<b>43.46 ± 3.02*</b>	<b>0.72</b>
<b>Total Lyso-Glycerophosphoethanolamines (LPE)</b>	<b>4.96 ± 0.36</b>	<b>3.66 ± 0.23*</b>	<b>0.74</b>
<b>Total Lyso-Glycerophosphoinositols (LPI)</b>	<b>5.40 ± 0.28</b>	<b>3.51 ± 0.36*</b>	<b>0.65</b>
<b>Total Lyso-Glycerophosphoserines (LPS)</b>	<b>5.31 ± 0.27</b>	<b>3.54 ± 0.30*</b>	<b>0.67</b>
Total Glycerophosphocholines (PC)	15685.80 ± 1134.25	14329.06 ± 819.96	0.91
Total Glycerophosphoethanolamines (PE)	2668.36 ± 124.22	2491.88 ± 80.92	0.93
Total Glycerophosphoglycerols (PG)	38.18 ± 2.32	36.38 ± 1.38	0.95
Total Glycerophosphoinositols (PI)	603.44 ± 25.71	552.21 ± 23.50	0.92
Total Glycerophosphoserines (PS)	512.32 ± 26.65	472.93 ± 35.49	0.92
<b>Sphingolipids</b>			
<b>Total Ceramides</b>	<b>55.41 ± 5.44</b>	<b>37.66 ± 1.98*</b>	<b>0.68</b>
Total Hexosylceramides	67.68 ± 7.19	60.37 ± 8.78	0.89
Total Gangliosides GM1	13.34 ± 1.08	10.68 ± 0.82	0.80
<b>Total Gangliosides GM2</b>	<b>0.39 ± 0.04</b>	<b>0.58 ± 0.05*</b>	<b>1.49</b>
Total Gangliosides GM3	1.05 ± 0.09	1.11 ± 0.08	1.06
Total Gangliosides GD1	76.04 ± 4.83	61.41 ± 3.27	0.81
Total Sphingomyelins	548.17 ± 35.66	541.73 ± 23.91	0.99
Total Sulfoglycosphingolipids	576.35 ± 57.57	501.79 ± 65.14	0.87
<b>Sterol Lipids</b>			
Total Steryl esters	0.86 ± 0.10	0.79 ± 0.08	0.92
Cholesterol	61.61 ± 2.04	58.08 ± 1.82	0.94

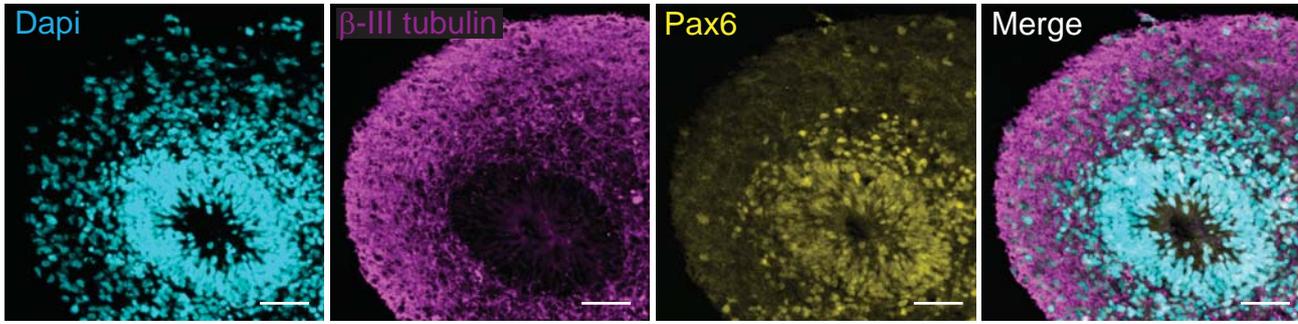
**Table 2:** Relative amounts of various classes of gangliosides in lysosome-enriched fractions obtained from the brains of eight-month-old *Spg11<sup>+/+</sup>* and *Spg11<sup>-/-</sup>* mice. Arbitrary units.

\*p < 0.05, T-test with Benjamini-Hochberg procedure to correct for multiple testing (n > 7). Significant differences are highlighted in bold

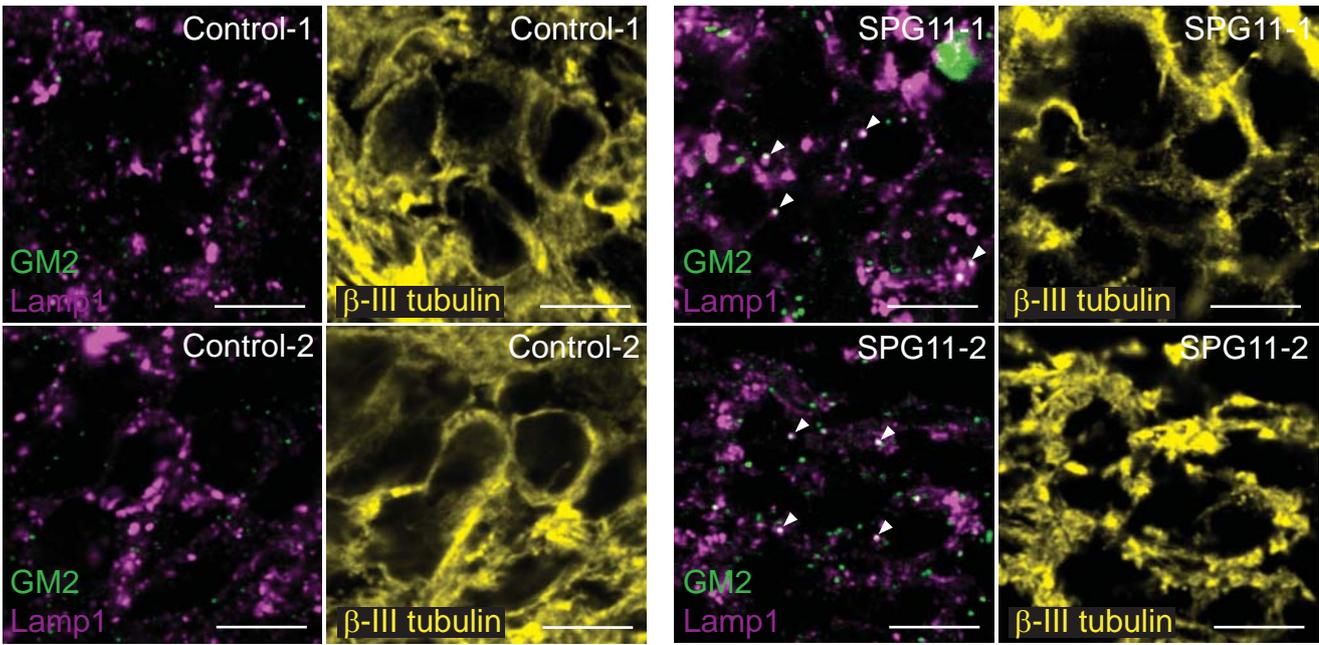
	<i>Spg11<sup>+/+</sup></i>	<i>Spg11<sup>-/-</sup></i>	Fold change
<b>GM3</b>			
<b>GM3 (d18:1/18:1)</b>	<b>14.2 ± 3.1</b>	<b>42.3 ± 5.3 *</b>	<b>2.98</b>
<b>GM3 (d18:1/18:0)</b>	<b>518.2 ± 89.5</b>	<b>1316.6 ± 194.1 *</b>	<b>2.54</b>
<b>GM3 (d18:1/20:0)</b>	<b>51.1 ± 8.7</b>	<b>170.3 ± 24.5 *</b>	<b>3.34</b>
<b>GM2</b>			
<b>GM2 (d18:1/18:0)</b>	<b>286.5 ± 46.3</b>	<b>957.6 ± 119.5 *</b>	<b>3.34</b>
<b>GM2 (d18:1/20:0)</b>	<b>68.9 ± 12.3</b>	<b>296.9 ± 40.9 *</b>	<b>4.31</b>
<b>GD3</b>			
<b>GD3 (d18:1/18:0)</b>	<b>155.8 ± 23.9</b>	<b>321.0 ± 45.2 *</b>	<b>2.06</b>
<b>GD3 (d18:1/18:0)</b>	<b>139.8 ± 26.7</b>	<b>307.7 ± 41.0 *</b>	<b>2.20</b>
<b>GD3 (d18:1/20:0)</b>	<b>39.9 ± 8.5</b>	<b>87.1 ± 12.3 *</b>	<b>2.18</b>
<b>GD2</b>			
<b>GD2 (d18:1/18:0)</b>	<b>53.1 ± 8.4</b>	<b>145.3 ± 22.7 *</b>	<b>2.73</b>
<b>GD2 (d18:1/20:0)</b>	<b>54.7 ± 10.9</b>	<b>159.9 ± 24.2 *</b>	<b>2.93</b>
<b>GM1</b>			
GM1 (d18:1/18:1)	52.8 ± 11.7	84.9 ± 10.7	1.61
GM1 (d18:1/18:0)	478.8 ± 87.2	778.7 ± 91.5	1.63
GM1 (d18:1/20:0)	198.6 ± 40.5	322.3 ± 42.7	1.62
<b>GD1</b>			
GD1 (d18:1/18:1)	280.2 ± 65.6	338.4 ± 40.1	1.21
GD1 (d18:1/18:0)	4025.6 ± 1221.1	4648.3 ± 615.8	1.15
OAc-GD1 (d18:1/18:0)	174.3 ± 39.3	222.2 ± 19.0	1.27
GD1 (d18:1/20:0)	1653.3 ± 404.0	1781.7 ± 225.9	1.08
<b>GT1</b>			
GT1 (d18:1/18:0)	493.4 ± 174.0	535.5 ± 74.3	1.09
OAc-GT1 (d18:1/18:0)	192.9 ± 60.9	243.4 ± 34.1	1.26
GT1 (d18:1/20:0)	220.6 ± 74.7	230.1 ± 32.5	1.04
OAc-GT1 (d18:1/20:0)	140.8 ± 37.8	163.7 ± 23.7	1.16



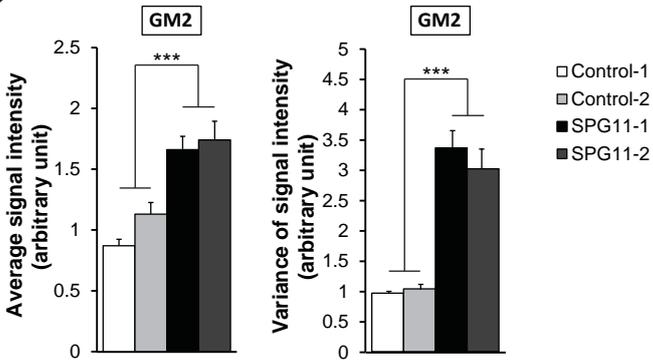
**A**



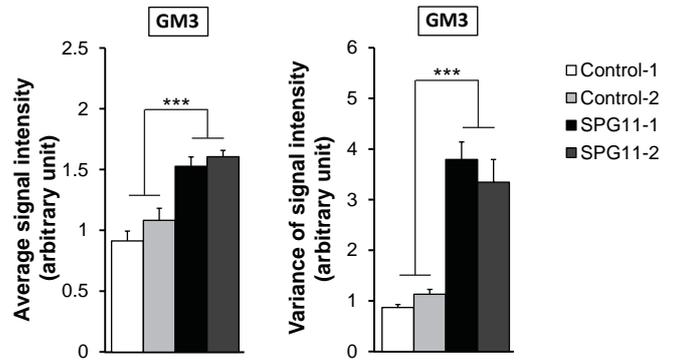
**B**



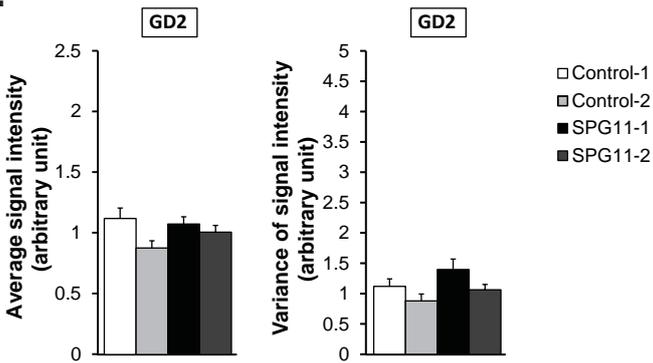
**C**



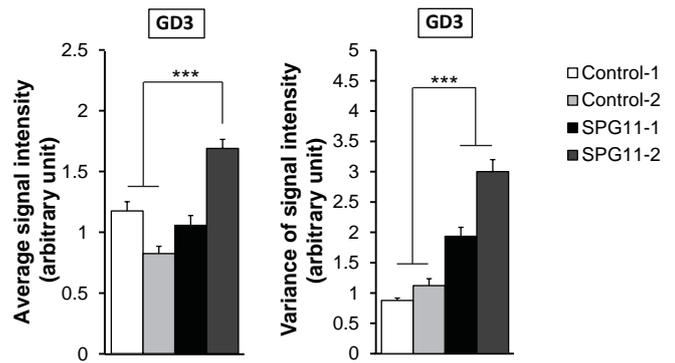
**D**



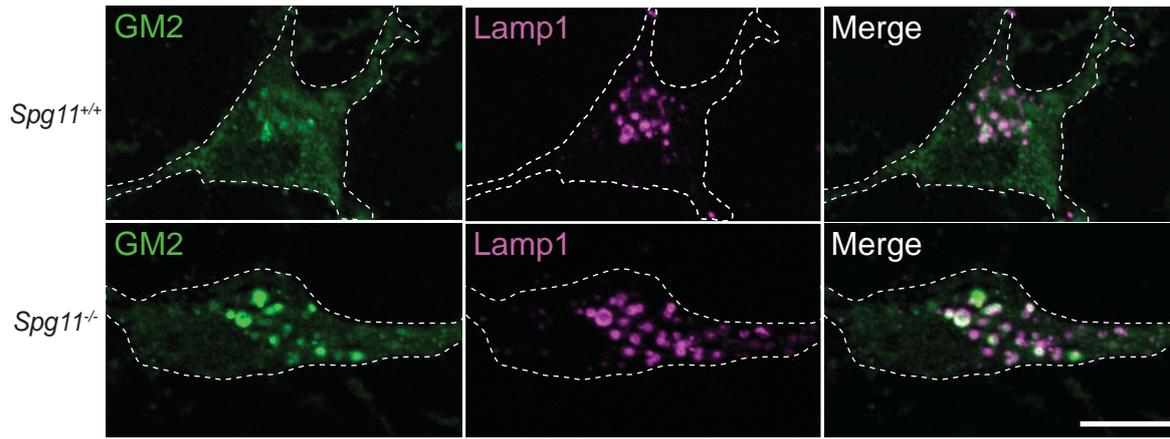
**E**



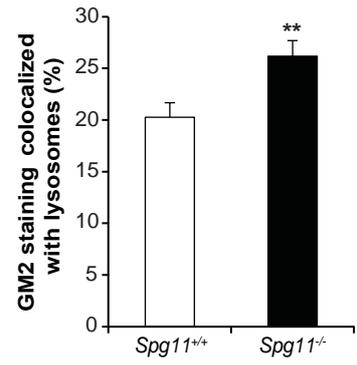
**F**



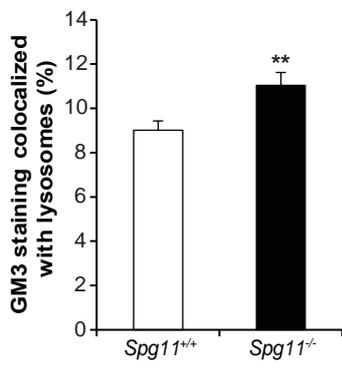
**A**



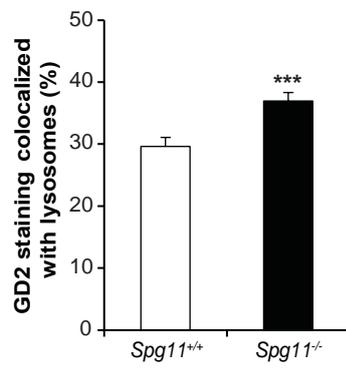
**B**



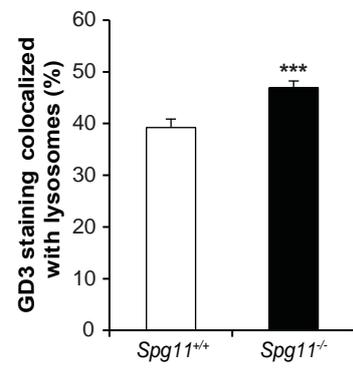
**C**

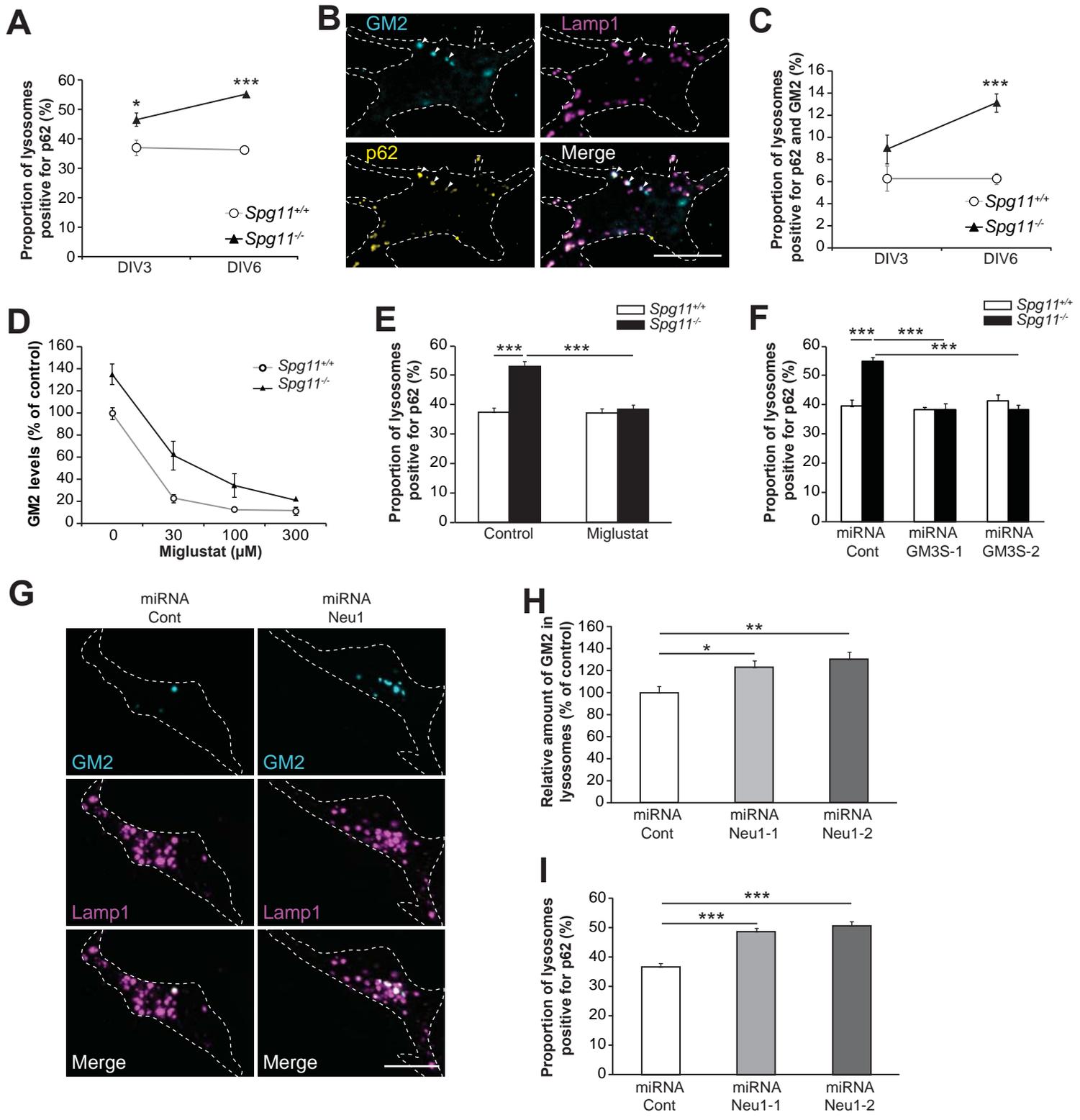


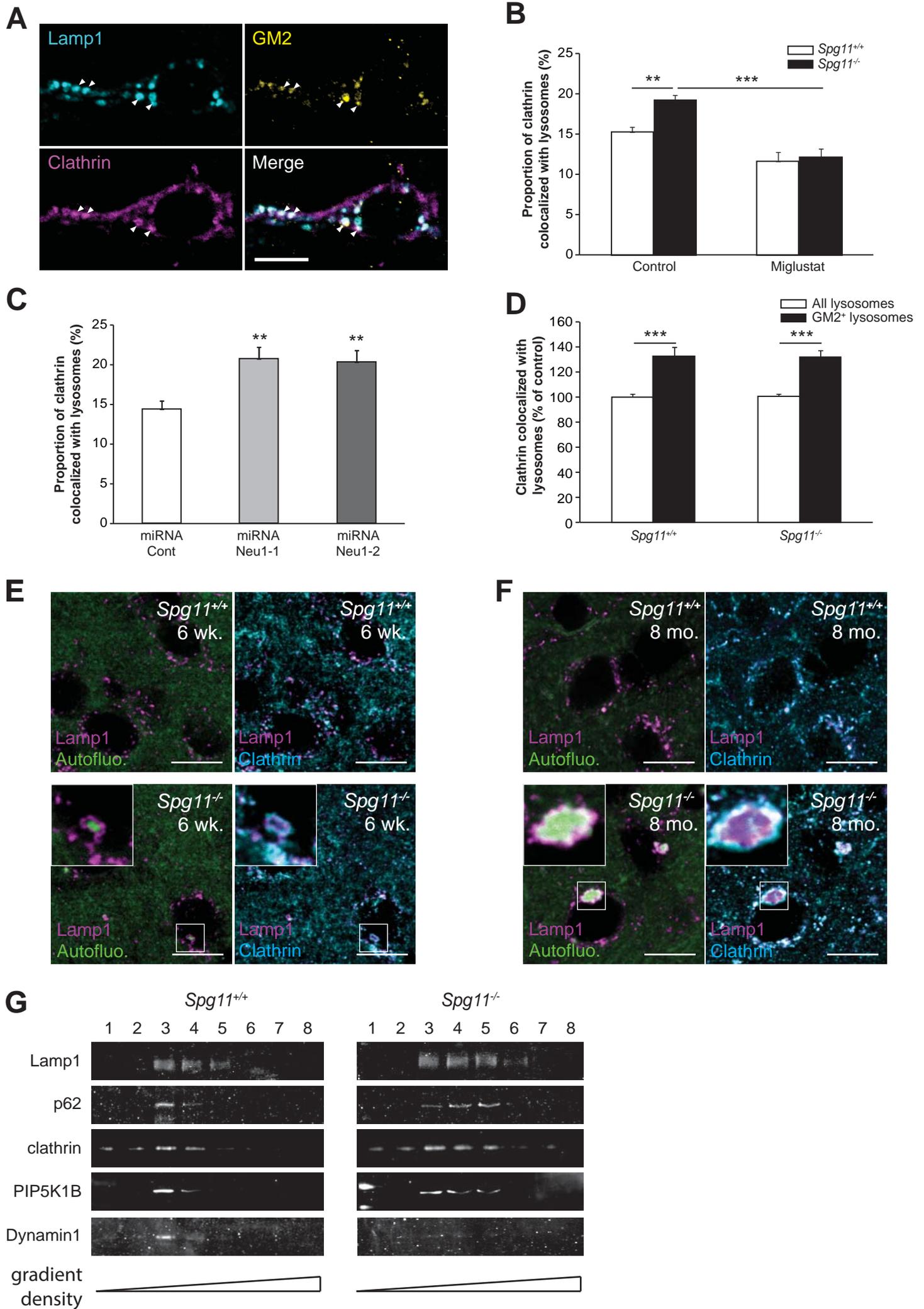
**D**

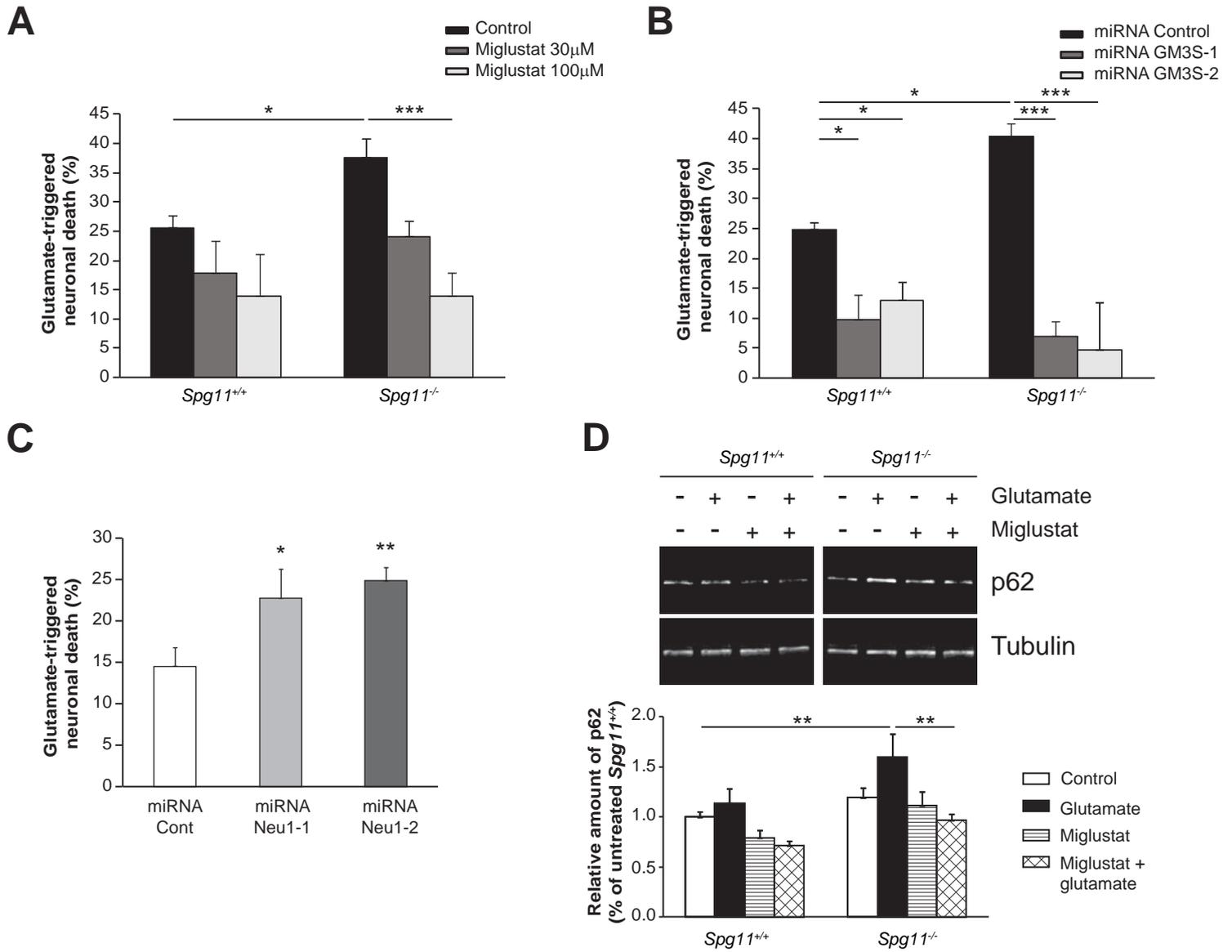


**E**









## Boutry et al., Supplementary Figure Legends

**Supplementary Figure 1:** Purification of lysosome-enriched fractions from *Spg11<sup>+/+</sup>* and *Spg11<sup>-/-</sup>* mouse brain.

- A. Scheme showing the procedure used to purify fractions enriched in lysosomes
- B. Western blot analysis of whole brain lysate, fractions S20, P20, and the lysosome-enriched fraction obtained from *Spg11<sup>+/+</sup>* and *Spg11<sup>-/-</sup>* mouse brain.

**Supplementary Figure 2.** Characterization of iPS cells derived from fibroblasts of healthy subjects or SPG11 patients. Immunostaining of iPS cells with pluripotency markers. Scale bar: 20 $\mu$ m.

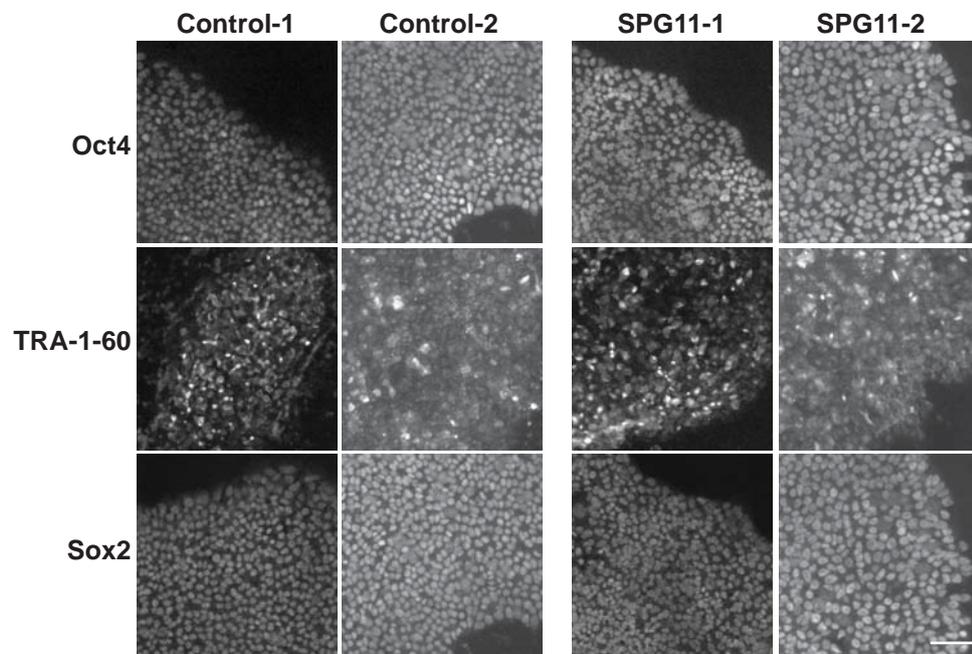
**Supplementary Figure 3:** Downregulation of GM3 synthase decreases ganglioside levels in cultured neurons

- A. qRT-PCR showing the decrease in GM3 synthase mRNA in mouse NIH-3T3 cells transfected with the vectors expressing two different miRNAs targeting the GM3 synthase or a control vector.  $N = 3$ . Kruskal-Wallis test,  $*p = 0.048$ ;  $**p = 0.003$ .
- B. GM2 immunostaining (Magenta) of cells transfected with vector expressing GFP and miRNA to downregulate GM3 synthase. The arrow indicates a cell transfected with miRNA against GM3 synthase, showing weak GM2 staining. Arrowheads indicate non-transfected cells. Scale bar: 10 $\mu$ m.
- C. Quantification of the fluorescence intensity of GM2 in neurons transfected with vectors expressing control miRNA or two different miRNAs against GM3 synthase.  $N > 50$  neurons in two independent experiments. One-way ANOVA;  $*p = 0.03$ ,  $***p < 0.001$ .

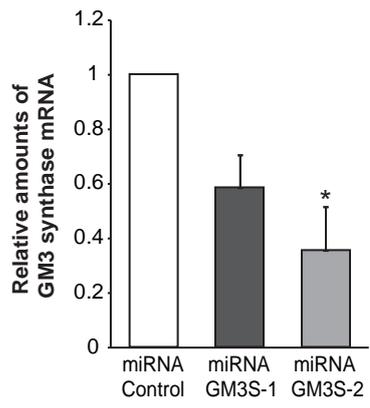
**Supplementary Figure 4:** Downregulation of Neu1 by transfection of vectors expressing specific miRNAs. qRT-PCR showing the decrease in Neu1 mRNA in mouse NIH-3T3 cells transfected with the vectors expressing two different miRNAs targeting Neu1 or a control vector.  $N = 4$ . Kruskal-Wallis test,  $*p < 0.05$ .



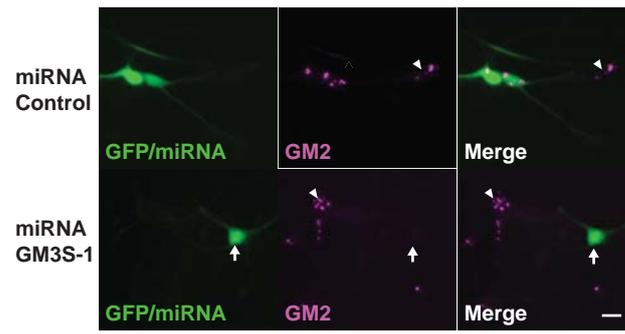
Boutry *et al.* Supplementary Figure 2



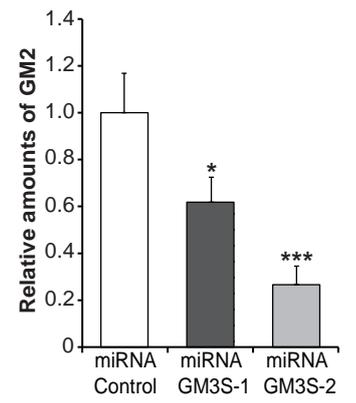
**A**



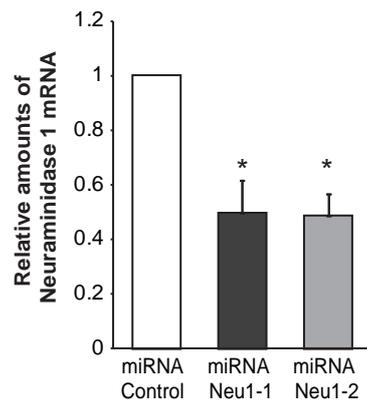
**B**



**C**



Boutry *et al.* Supplementary Figure 4



#### 4) Contribution :

Pour cette étude j'ai effectué les expériences et analyses sur les neurones embryonnaires en culture. J'ai réalisé la dissection des cortex d'embryons (E14,5) de souris, la mise en culture, l'entretien des cellules, les différents traitements, la fixation des cellules, les immunomarquages et une partie importante des prises d'images et analyses sur ces cellules.

Après l'identification des espèces lipidiques qui s'accumulent dans les lysosomes des cerveaux des souris mutantes, j'ai réalisé des immunomarquages contre ces différents gangliosides dans les neurones en culture. En les couplant avec un marquage des lysosomes j'ai pu mesurer la colocalisation entre ces gangliosides et les lysosomes pour ainsi évaluer leur accumulation dans les lysosomes. Les images ont été prises avec un microscope équipé d'un système Apotome qui permet d'obtenir une section optique et qui est ainsi utilisable pour des analyses de colocalisation. J'ai ainsi pu confirmer l'accumulation des différents gangliosides simples (GM2, GM3, GD2 et GD3) dans les lysosomes des neurones *in vitro*.

J'ai pu ensuite montrer que le GM2, que nous avons choisi comme marqueur des niveaux de gangliosides, se retrouve principalement dans des autolysosomes. Ces organites sont caractérisés par un marquage positif pour les protéines Lamp1 et p62. Pour tester si les gangliosides jouent un rôle dans l'augmentation du nombre d'autolysosomes, et donc probablement dans la reformation des lysosomes, j'ai diminué les niveaux des gangliosides dans les cellules. Deux méthodes ont été choisies : l'inhibition pharmacologique de leur synthèse (miglustat) et l'inhibition de l'expression d'une enzyme clef de la synthèse par ARN interférent (miRNA contre la GM3 synthase). J'ai ainsi validé ces deux méthodes en mesurant les niveaux de gangliosides dans les cellules après traitement et observé que la proportion d'autolysosomes était réduite par ces traitements. Ces résultats suggèrent que l'augmentation du nombre d'autolysosomes est la conséquence de l'accumulation des gangliosides en leur sein.

Dans le but de valider cette hypothèse j'ai induit l'accumulation de gangliosides dans les lysosomes en ciblant par ARN interférence l'expression d'une enzyme impliquée (la neuraminidase 1) dans leur catabolisme. Cette stratégie a effectivement permis d'induire l'accumulation de gangliosides GM2 dans les lysosomes causant une augmentation de la proportion d'autolysosomes.

Nous avons ensuite observé une augmentation du recrutement de la clathrine au niveau des autolysosomes contenant des gangliosides. Ce recrutement accru a pu être induit par la diminution de l'expression de la neuraminidase 1. Le recrutement de la dynamine 1, qui participe à la fission des vésicules et tubules dans la reformation des lysosomes, est fortement diminué en absence de

spatacsine. Ainsi, les accumulations de gangliosides perturbent la cascade de recrutement des protéines participant au recyclage des lysosomes.

Enfin, j'ai réalisé les expériences sur la mort neuronale *in vitro*. Puisque les cellules *SpG11<sup>-/-</sup>* ne montraient pas de mort spontanée nous avons choisi d'évaluer le rôle des accumulations de gangliosides sur la mort neuronale induite par le glutamate. En effet, le glutamate semble impliqué dans plusieurs maladies neurodégénératives (Blasco et al., 2014; Kostic et al., 2013) et induit une augmentation des niveaux de gangliosides (Park et al., 2016a). J'ai alors traité les cellules pour diminuer ou augmenter les accumulations de gangliosides et évaluer les conséquences sur la mort neuronale.

Les échantillons utilisés en lipidomique (cortex et fractions enrichies en lysosomes) ont été préparés par Julien Branchu et Frédéric Darios. Les analyses et traitements des données lipidomiques ont été conduits par Alexandre Seyer, Marion Poirel et Benoit Colsch. Les travaux sur les coupes histologiques de cerveaux de souris ont été effectués par Julien Branchu. La culture des organoïdes et leur caractérisation a été le travail de Céline Lustremant et Julie Pernelle. Les marquages et analyses des niveaux de gangliosides de ces organoïdes a été effectués par Julie Pernelle et Julien Branchu. J'ai pu grandement bénéficier de l'aide de Frédéric Darios, Raphaël Matusiak et Alexandre Pierga.

Pour ce travail j'ai également contribué activement à la conception des expériences avec Frédéric Darios, Giovanni Stevanin et Julien Branchu. J'ai participé à l'écriture du manuscrit qui a été effectué principalement par Frédéric Darios. Cette étude est donc un travail collectif qui a impliqué toutes les personnes de l'équipe dirigée par Frédéric Darios.

## 5) Discussion :

Le fonctionnement normal des lysosomes est très important pour les neurones et leur survie (Nixon, 2013). L'étude des mécanismes participant ou perturbant leur recyclage revêt une grande importance pour la compréhension et le traitement des pathologies du système nerveux. La perte de fonction de la spatacsine, qui est responsable de la PSH de type SPG11, induit une accumulation d'autolysosomes (Chang et al., 2014; Varga et al., 2015). Une étude a proposé que la spatacsine serait impliquée dans la reformation des lysosomes, et plus particulièrement, dans l'initiation de ce phénomène (Chang et al., 2014). Nous avons précédemment montré que l'absence de spatacsine provoque une accumulation de lipides dans les lysosomes (Branchu et al., 2017). Nous avons voulu étudier les liens entre ces accumulations et la perturbation du recyclage des lysosomes, en utilisant

notamment des neurones en culture. La reformation des lysosomes n'a été, jusqu'ici, jamais étudiée dans des neurones.

La reformation des lysosomes après autophagie fait intervenir la tubulation des autolysosomes dans des cellules de type fibroblastes, en présence de nutriments le recyclage pourrait avoir lieu par une vésiculation des membranes (Sridhar et al., 2013). La tubulation des lysosomes n'a jamais été observée dans des neurones ce qui suggère que le recyclage pourrait ne pas faire intervenir de tubulation et se dérouler principalement par vésiculation. Toutefois des expériences complémentaires sont nécessaires pour clarifier le processus de reformation dans les neurones. Lors de notre étude nous avons probablement étudié la reformation des lysosomes par vésiculation.

Nous avons montré que plusieurs gangliosides simples (GM2, GM3, GD2 et GD3) s'accumulent dans les lysosomes en absence de spatacsine et cela s'aggrave avec le temps. Les accumulations ont été observées dans les cerveaux des souris mutantes et dans les neurones embryonnaires *Spg11*<sup>-/-</sup> en culture ainsi que dans des organoïdes produits à partir de cellules souches pluripotentes induites humaines portant des mutations dans le gène *SPG11*. Ces résultats suggèrent la pertinence de nos résultats pour l'étude de la pathologie humaine. Ces gangliosides pourraient par ailleurs représenter les premiers biomarqueurs de la PSH SPG11.

Les accumulations des gangliosides sont présentes dans les lysosomes marqués par la protéine p62, et donc dans des autolysosomes. Ces données suggèrent que ces deux paramètres sont liés. Nos résultats sur la modulation des niveaux de gangliosides dans les cellules soutiennent cette hypothèse. L'inhibition de leur synthèse diminue le nombre d'autolysosomes tandis que la concentration de gangliosides dans les autolysosomes l'augmente. Ces données suggèrent que l'accumulation de gangliosides dans les autolysosomes perturbe le recyclage des lysosomes. Ce phénomène semble être indépendant de la spatacsine puisque l'accumulation de gangliosides dans les lysosomes des cellules sauvages augmente aussi le nombre d'autolysosomes.

Les niveaux anormalement élevés de gangliosides dans les autolysosomes semblent perturber le recrutement de certaines protéines participant à la reformation des lysosomes. Le recrutement de la clathrine est augmenté. Cette augmentation est retrouvée dans les lysosomes contenant du GM2 en présence ou en absence de spatacsine suggérant que c'est l'accumulation de gangliosides et pas la perte de fonction de la spatacsine qui altère la reformation des lysosomes. Nous avons ensuite montré, dans des fractions de cerveaux enrichies en lysosomes, que le recrutement de la dynamine 1 aux lysosomes est fortement réduit en l'absence de spatacsine. La dynamine 2 est impliquée dans le phénomène de scission des vésicules et tubules qui formeront alors les nouveaux lysosomes dans des cellules de types fibroblastes (Schulze et al., 2013; Zou et al., 2015). Nous pouvons envisager

un rôle similaire pour la dynamine 1 dans les neurones (les neurones expriment principalement la dynamine 1). Les accumulations de gangliosides dans les autolysosomes des neurones *Spg11<sup>-/-</sup>* pourraient empêcher le recyclage des lysosomes en altérant la fonction de certaines de leurs protéines. Par exemple, la bonne mise en place de la clathrine pourrait être empêchée, ce que pourrait traduire l'augmentation du marquage de la clathrine comme cela a été proposé dans un autre contexte (Sridhar et al., 2013). Dans les MSL les accumulations primaires et secondaires peuvent perturber les fonctions de certaines protéines induisant des perturbations de diverses fonctions cellulaires (Platt et al., 2012). Nous pourrions nous trouver dans un cas similaire dans notre modèle SPG11. Les dysfonctions du recyclage semblent ainsi plus provenir d'un désordre du métabolisme des gangliosides que d'une perte de fonction de la spatacine. La protéine ne serait peut-être pas impliquée directement dans le processus comme proposé précédemment (Chang et al., 2014).

Déterminer l'impact des accumulations de gangliosides et du recyclage défaillant des lysosomes sur la mort neuronale est très important. En effet, des accumulations de gangliosides, et en particulier du GM2, ont été rapportées dans plusieurs pathologies : les maladies de Sandhoff (Sandhoff, 2012), de Tay-sachs (Karimzadeh et al., 2014), de Niemann-Pick de Type A et C (Walkley and Vanier, 2009a) ou encore la maladie d'Alzheimer (Kalanj et al., 1991; Kracun et al., 1992; Molander-Melin et al., 2005; Pernber et al., 2012). La reformation des lysosomes est perturbée dans des MSL (Platt et al., 2012) et un grand nombre de gènes codant des protéines jouant un rôle dans l'ALR, sont associés à des maladies neurodégénératives quand ils sont mutés. Pour tester si les niveaux élevés de gangliosides participent à la mort neuronale, nous avons modulé leurs niveaux et mesuré la mort des neurones induite par le glutamate. Les cellules *Spg11<sup>-/-</sup>* sont plus sensibles au glutamate et diminuer l'accumulation des gangliosides permet de prévenir la mort des neurones, tandis que forcer l'accumulation de gangliosides dans les neurones l'augmente. Ces données suggèrent que les accumulations de gangliosides pourraient participer à la neurodégénérescence, notamment en perturbant la reformation des lysosomes.

Ainsi cibler la synthèse des gangliosides pourrait être une approche thérapeutique dans certaines pathologies et notamment la PSH de type SPG11. Il serait intéressant de tester si de telles accumulations sont présentes dans d'autres PSH notamment. Toutefois cette approche thérapeutique doit être éprouvée dans un contexte *in vivo*.

## 6) Conclusion :

La perte de fonction de la spatacine est responsable de l'accumulation progressive de gangliosides au sein des lysosomes et plus particulièrement des autolysosomes. Ces accumulations perturbent le recyclage des membranes des lysosomes, probablement en empêchant le recrutement de certaines protéines clés du processus dont la dynamine. Les niveaux élevés de gangliosides pourraient être impliqués dans la mort neuronale comme le suggèrent nos résultats *in vitro*. Notre étude montre que cibler la synthèse des gangliosides pourrait représenter une potentielle approche thérapeutique.



### III) Article 3 : Des altérations de l'homéostasie calcique contribuent à l'accumulation de cholestérol dans les lysosomes des cellules *Spg11*<sup>-/-</sup> :

#### **Store operated calcium entry contributes to lysosomal accumulation of cholesterol.**

**Maxime Boutry**, Raphaël Matusiak, Julien Branchu, Typhaine Esteves, Julie Pernelle, Yoan Ibrahim, Alexis Brice, Khalid Hamid El Hachimi, Giovanni Stevanin, Frédéric Darios.

(En Préparation)

#### **1) Introduction :**

En parallèle à la seconde étude portant sur les accumulations de gangliosides dans les neurones et leurs conséquences sur le recyclage des lysosomes, j'ai cherché à comprendre les mécanismes physiopathologiques qui sont impliqués dans l'accumulation de lipides dans les lysosomes des fibroblastes murins *Spg11*<sup>-/-</sup>. En effet, les lysosomes de ces cellules accumulent des lipides (Branchu et al., 2017). J'ai aussi cherché à identifier quelle espèce lipidique pourrait s'accumuler en absence de spatacsine dans ces fibroblastes puisque les niveaux de gangliosides sont faibles dans ces cellules et, même s'ils semblent s'accumuler dans les lysosomes de ces cellules (voir partie IV des résultats), il apparaît que ce ne sont pas les lipides qui s'accumulent majoritairement dans les lysosomes des fibroblastes murins *Spg11*<sup>-/-</sup>.

Le point de départ de cette étude est une observation réalisée lors de l'analyse des images de microscopie électronique des cerveaux de souris mutantes pour le gène *Spg11*. Lors de cette analyse, focalisée sur la morphologie des lysosomes, nous avons observé une forte augmentation du nombre et de la taille des zones de contact entre le réticulum et la membrane plasmique. Ces zones de contact participent au transfert de lipides entre les deux organites et à l'import de calcium extracellulaire par le « Store Operated Calcium Entry (SOCE) » (Saheki and De Camilli, 2017). Des altérations de l'homéostasie calcique sont très souvent impliquées dans des maladies neurodégénératives (Mattson, 2007). Nous avons donc étudié si le processus du SOCE était altéré dans les fibroblastes embryonnaires murins en absence de spatacsine et si cela pourrait être lié aux dysfonctions des lysosomes observées en absence de spatacsine (Branchu et al., 2017) et en particulier aux accumulations de lipides dans ces organites.

Les ions calcium ( $Ca^{2+}$ ) sont fortement compartimentalisés dans les cellules. La régulation de l'homéostasie calcique cellulaire est cruciale pour de nombreuses fonctions cellulaires ainsi que pour leur survie. De nombreux mécanismes sont mis en place par les cellules pour réguler dans le temps et dans l'espace les taux de calcium dans les différents compartiments cellulaires.

## L'homéostasie calcique cellulaire :

### (i) Signalisation calcique :

Les cellules doivent pouvoir s'adapter aux changements de leur environnement, pour cela elles font intervenir des voies de signalisation qui ont besoin de messagers dont font partie les ions calcium (Clapham, 2007). La transduction de signaux fait intervenir le changement de conformation et de charges de protéines, ce qui permet de modifier leurs fonctions. Les cellules utilisent principalement les ions phosphates et calcium pour remplir ce rôle (Clapham, 2007). De nombreuses protéines sont capables de lier le calcium, modifiant leurs fonctions. A l'échelle de l'organisme le calcium participe à de nombreuses fonctions, on peut citer : la coagulation, la contraction musculaire ou encore la libération de neurotransmetteurs (Esmon, 2000; Kaeser and Regehr, 2014; Wakabayashi, 2015).

### (ii) Régulation taux de calcium et compartimentation:

Les cellules ont développées de nombreux systèmes pour réguler les taux de calcium dans leurs différents compartiments. Les concentrations basales en calcium varient selon les organites et la concentration dans le cytosol est faible, de l'ordre de 100nM, d'une part parce qu'un surplus serait toxique pour la cellule (de nombreuses protéases, phosphatases, phospholipases ou endonucléases sont activées en présence trop importante de calcium) mais aussi parce que l'établissement d'un gradient local permet d'accélérer et d'augmenter l'efficacité des signaux calciques (Clapham, 2007). Ainsi, la concentration en ions  $\text{Ca}^{2+}$  est d'environ 1 à 2mM dans le milieu extracellulaire tandis qu'elle est de l'ordre d'une centaine de nM dans le cytosol.

### (iii) Le réticulum endoplasmique ; le réservoir principal de calcium intracellulaire :

Les cellules stockent le calcium dans leurs organites et principalement dans le réticulum endoplasmique où le calcium est en grande partie complexé avec des protéines comme la calséquestrine ou la calréticuline (Koch, 1990). De nombreuses protéines du réticulum endoplasmique ont besoin de calcium pour fonctionner, c'est le cas des protéines chaperons dont beaucoup participent aussi au stockage du calcium (Lièvreumont et al., 1997; Papp et al., 2003). Ces protéines participent au repliement tridimensionnel de protéines nouvellement produites ou en cours de traduction. Ainsi, une diminution des taux de calcium dans le réticulum endoplasmique induit un stress de l'organite avec l'accumulation de protéines mal repliées, ce qui déclenche l'« unfolded protein response » (UPR) (Mekahli et al., 2011). Si le stress est trop important ou que l'UPR est insuffisant pour le corriger, l'apoptose est déclenchée (Mekahli et al., 2011; Ryu et al., 2002). Le maintien de l'homéostasie calcique est alors indispensable à la survie des cellules mais aussi au bon fonctionnement d'un grand nombre de voies cellulaires.

Le réticulum endoplasmique capte du calcium depuis le cytosol par l'intermédiaire des pompes SERCA (sarco endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase). Deux types de canaux calciques permettent la libération de calcium du réticulum endoplasmique : les récepteurs à la ryanodine et les récepteurs à l' $\text{IP}_3$  ( $\text{IP}_3\text{R}$ ). (Verkhatsky, 2005). Les récepteurs à la ryanodine sont exprimés ubiquitairement mais principalement dans les muscles et les neurones et sont par conséquent très importants pour la contraction musculaire (Lanner, 2012). Les  $\text{IP}_3\text{R}$  sont exprimés ubiquitairement et sont impliqués dans de très nombreuses fonctions cellulaires par leurs actions de libération de calcium (Prole and Taylor, 2016). Ils sont activés par l' $\text{IP}_3$  (Inositol tri-phosphate ou  $\text{Ins}(1,4,5) \text{P}_3$ ) qui est produit par conversion du phosphatidylinositol biphosphate ( $\text{PIP}_2$ ) en diacylglycérol (DAG) et  $\text{IP}_3$  par la phospholipase C qui est activée par la liaison d'un ligand à un récepteur de la membrane plasmique, récepteur couplé à une protéine G ou récepteur à activité tyrosine kinase (Figure 32) (Taylor et al., 2014). L'activation du canal induit son ouverture et la diffusion de calcium du réticulum endoplasmique vers le cytosol.

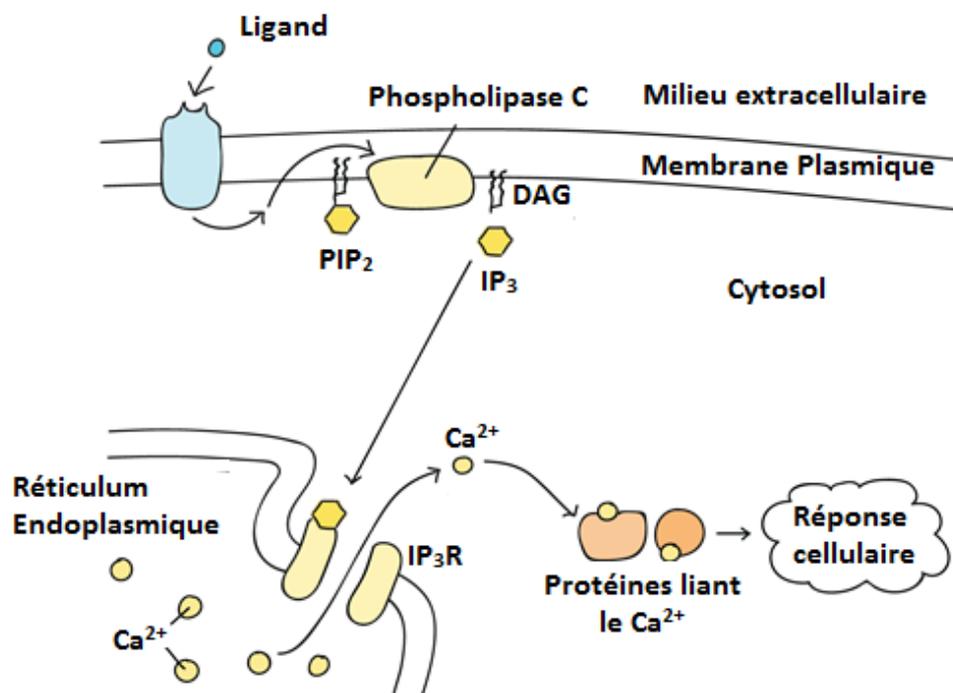


Figure 32 : Activation des récepteurs à l' $\text{IP}_3$ . Suite à la fixation d'un ligand sur son récepteur (récepteur couplé à une protéine G ou récepteur à activité tyrosine kinase) la phospholipase C est activée et hydrolyse le  $\text{PIP}_2$  en DAG et en  $\text{IP}_3$ . L' $\text{IP}_3$ , soluble, diffuse dans le cytosol et active les  $\text{IP}_3\text{R}$  dont l'ouverture induit la diffusion du calcium dans le cytosol modulant des voies cellulaires. Adapté de <https://www.khanacademy.org/science/biology/cell-signaling/mechanisms-of-cell-signaling/a/intracellular-signal-transduction>.

(iv) Echanges de calcium du réticulum vers d'autres organites :

Le réticulum endoplasmique est le principal stock de calcium dans la cellule. De nombreux échanges de calcium entre le réticulum endoplasmique et les autres organites ont lieu au niveau de zones de contacts entre ces organites (Phillips and Voeltz, 2016). De tels échanges ont lieu notamment avec les mitochondries, les endosomes ou encore les lysosomes (Figure 33) (van der Kant and Neefjes, 2014; López-Sanjurjo et al., 2013; Rizzuto et al., 2009). Le réticulum endoplasmique et ces différents organites établissent des contacts rapprochés (de l'ordre de 10-20nm) sans fusion entre les membranes, à l'aide de machineries protéiques qui maintiennent les contacts entre les deux organites (Phillips and Voeltz, 2016). Le calcium est libéré du réticulum endoplasmique, principalement via les récepteurs à l'IP3 (Figure 32, 33), induisant la création d'un micro-domaine où la concentration en calcium est de l'ordre de quelques dizaines de  $\mu\text{M}$  (Rizzuto et al., 1993, 1998) permettant à l'organite receveur de capter du calcium.

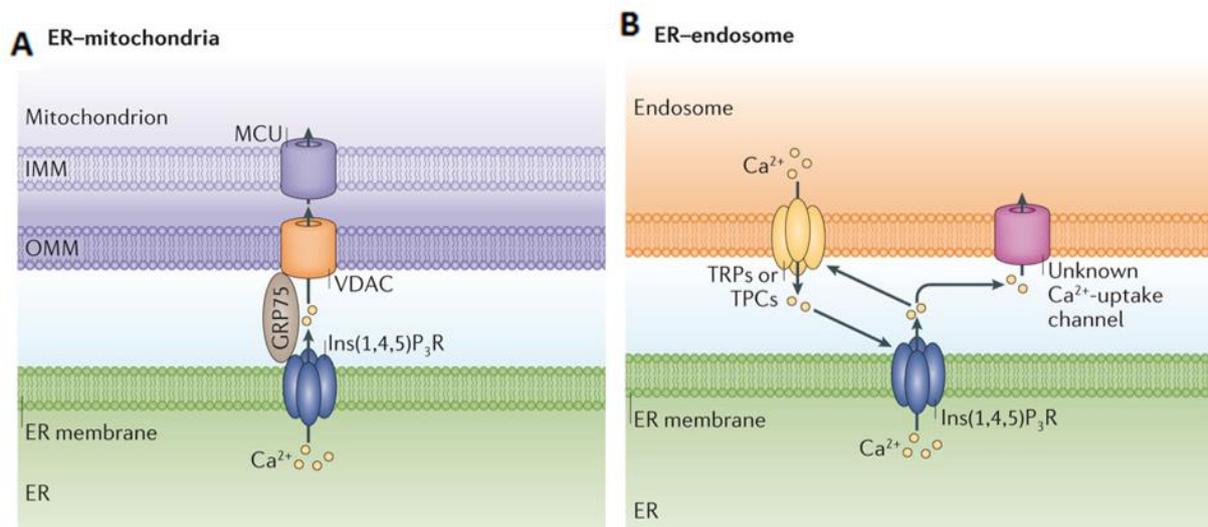


Figure 33: Echange de calcium, au niveau de zones de contact, entre le réticulum endoplasmique et (A) les mitochondries : ces dernières captent du calcium libéré par le réticulum endoplasmique au niveau de zones de contact entre les deux organites. (B) De manière analogue les endosomes captent du calcium, via un canal dont l'identité moléculaire est inconnue, en provenance du réticulum. Les endosomes sont aussi capables de libérer du calcium dans le cytosol via les canaux calciques TRPs ou TPCs (Phillips and Voeltz, 2016).

(v) Les lysosomes et le calcium :

Le rôle des lysosomes comme réservoir de calcium intracellulaire a été décrit relativement récemment (Christensen et al., 2002; Churchill et al., 2002; Patel and Docampo, 2010). La concentration en calcium dans la lumière de ces organites serait d'environ  $500\mu\text{M}$ , ce qui est proche de celle du réticulum endoplasmique (Christensen et al., 2002; Lloyd-Evans et al., 2008). Le calcium des lysosomes peut être libéré dans le cytosol par stimulation de signaux intracellulaires comme le NAADP (Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate) (Christensen et al., 2002; Churchill et al.,

2002). Ces signaux calciques sont impliqués dans les fonctions des lysosomes mais pourraient aussi être impliqués dans des signaux calciques plus globaux et notamment en interagissant avec des signaux en provenance du réticulum endoplasmique (Kilpatrick et al., 2013, 2016; Raffaello et al., 2016). Les lysosomes sont ainsi équipés d'un ensemble de canaux et pompes leur permettant de libérer et de capter du calcium (Feng and Yang, 2016).

L'identité moléculaire de la (ou des) pompe(s) impliquée(s) dans la captation du calcium par les lysosomes n'est pas connue. Toutefois le processus pourrait être dépendant du gradient de pH établi par la V-ATP-ase (Morgan et al., 2011). En effet, l'inhibition de cette pompe, et par conséquent la perte du gradient de pH, induit une forte diminution de la quantité de calcium dans les lysosomes (Christensen et al., 2002; Lloyd-Evans et al., 2008). De plus, les levures possèdent un échangeur  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$  dans les vacuoles (équivalent des lysosomes chez la levure) (Morgan et al., 2011). Toutefois, une étude récente suggère que les lysosomes sont capables de refournir leur stock en calcium en absence du gradient de pH (Garrity et al., 2016). Selon cette étude c'est le calcium du réticulum endoplasmique qui est nécessaire pour que les lysosomes se refournissent en calcium. Ainsi, la déplétion de calcium du réticulum endoplasmique empêche les lysosomes de se remplir en calcium. Ces résultats sont cohérents avec l'intime interaction entre le réticulum endoplasmique et les lysosomes (Kilpatrick et al., 2013). Des études complémentaires doivent être menées pour espérer une meilleure compréhension du phénomène, notamment la nature des interacteurs moléculaires qui y participent.

Plusieurs canaux calciques permettant aux lysosomes de libérer du calcium dans le cytosol ont été décrits jusqu'à présent (Figure 34). Il s'agit des TRPML, des TPCs (Two-Pore Channels), P2X4, TRPM2, les « P/Q Type Voltage-Gated  $\text{Ca}^{2+}$  Channels (VGCCS) » ou encore TRPA1 (Feng and Yang, 2016). Les canaux dont la fonction est la mieux connue sont les TRPML (et en particulier TRPML1) et les TPCs. Seuls ces canaux seront présentés dans ce manuscrit. Il existe 3 TRPMLs. Ils sont localisés au niveau des endosomes tardifs et des lysosomes (TRPML 2 et 3 sont aussi présents au niveau des endosomes précoces) (Feng and Yang, 2016). TRPML1, le mieux étudié des trois, est un canal cationique qui laisse passer le calcium de manière non sélective et qui est activé par le  $\text{PI}(3,5)\text{P}_2$  (Dong et al., 2010). Comme présenté dans l'introduction de ce manuscrit, des mutations qui conduisent à une perte de fonction de TRPML1 sont à l'origine d'une MSL : la mucopolysaccharidose de type IV (Bach, 2001). De nombreux lipides s'accumulent dans les lysosomes des cellules en cas de perte de fonction de TRPML1. Les signaux calciques en provenance de TRPML1 sont impliqués dans de nombreuses fonctions des lysosomes comme l'exocytose, la réparation de la membrane plasmique, l'autophagie ou encore la reformation des lysosomes (Cheng et al., 2014; Li et al., 2016; Medina et al., 2015; Park et al., 2016b). Les TPCs sont les canaux calciques qui



Les protéines STIM (stromal interaction molecule), et en particulier STIM1, sont des protéines transmembranaires du réticulum endoplasmique qui sont capables de détecter une diminution des niveaux de calcium dans la lumière de l'organite via leur domaine de liaison au calcium : « EF-Hand » (Soboloff et al., 2012). Lorsque la concentration en calcium du réticulum endoplasmique diminue, les protéines STIM ne lient plus le calcium et changent de conformation. Ce changement de conformation induit l'oligomérisation des protéines STIM au niveau de zones de contact entre le réticulum endoplasmique et la membrane plasmique par l'action d'un domaine de liaison au PIP<sub>2</sub>, un phosphoinositide enrichi sur la face interne de la membrane plasmique au niveau de ces zones de contact (Carrasco and Meyer, 2011). Les protéines s'oligomérisent et vont activer, par interaction directe, les canaux calciques Orai (en particulier Orai1) qui sont situés à la membrane plasmique. L'activation de ces canaux induit l'entrée massive de calcium extracellulaire dans le cytoplasme des cellules. Ce calcium est ensuite réimporté dans le réticulum endoplasmique ce qui inactive les protéines STIM et participe à arrêter le mécanisme (Figure 35).

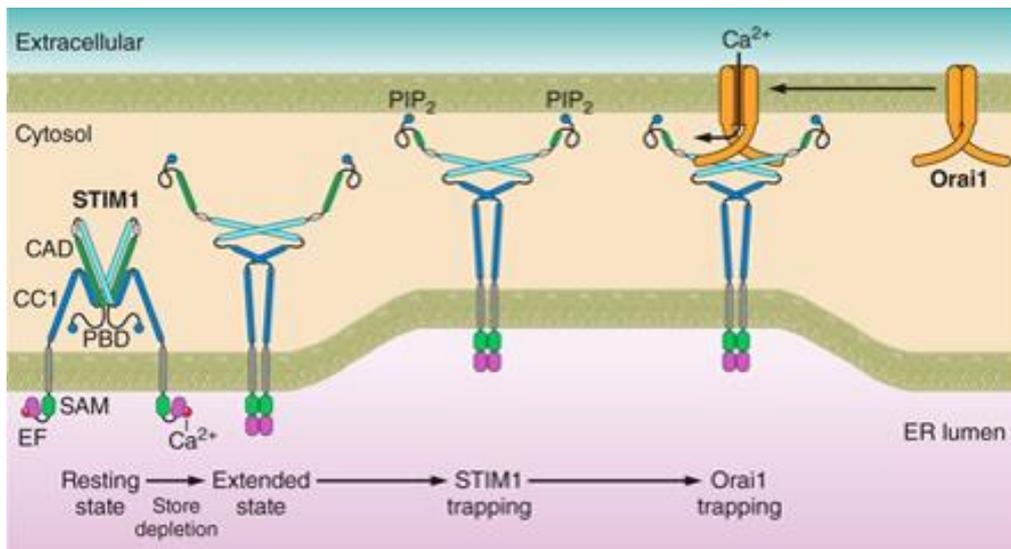


Figure 35: Représentation schématique du SOCE. Les protéines STIM (ici STIM1) changent de conformation en réponse à une diminution des taux de calcium dans le réticulum endoplasmique. Elles migrent alors au niveau de zones de contact avec la membrane plasmique, s'oligomérisent (non représenté ici) et activent les canaux calciques ORAI ce qui induit une entrée de calcium dans le cytosol (Prakriya and Lewis, 2015).

Le SOCE est un mécanisme ubiquitaire qui est aussi présent dans les neurones. Ce processus permet aux cellules de reconstituer leur stock en calcium, de réguler les niveaux de calcium cytosolique et participe aussi à des voies de signalisation. Par exemple, dans des cellules immunitaires la production d'Interleukine-2 peut être stimulée via l'activation du facteur de transcription NFAT (nuclear factor of activated T-cells) suite à une entrée de calcium extracellulaire par le SOCE (Jara et al., 2014). Le SOCE est impliqué dans d'autres voies de signalisation et fonctions cellulaires

comme dans le métabolisme des lipides (Maus et al., 2017) ou encore le guidage axonal (Majewski and Kuznicki, 2015).

L'augmentation trop importante de calcium dans les cellules étant toxique, plusieurs mécanismes de régulation du SOCE existent. Par exemple, la protéine SARAF participe à l'inhibition du SOCE dans le but d'éviter une surcharge de calcium dans le cytosol de la cellule (Palty et al., 2012). Plus récemment, des domaines de liaison au cholestérol ont été identifiés dans les protéines Orai1 et STIM1. La liaison du cholestérol à ces protéines inhibe leur activité et donc réduit l'entrée de calcium extracellulaire (Derler et al., 2016; Pacheco et al., 2016).

(vii) Régulation de l'homéostasie calcique entre les compartiments cellulaires étudiés au cours de la thèse :

Comme nous venons de le voir, la régulation de l'homéostasie calcique est un phénomène complexe qui fait intervenir presque tous les compartiments cellulaires. La figure 36 rassemble les éléments principaux concernant la régulation de l'homéostasie calcique étudiée dans cette thèse.

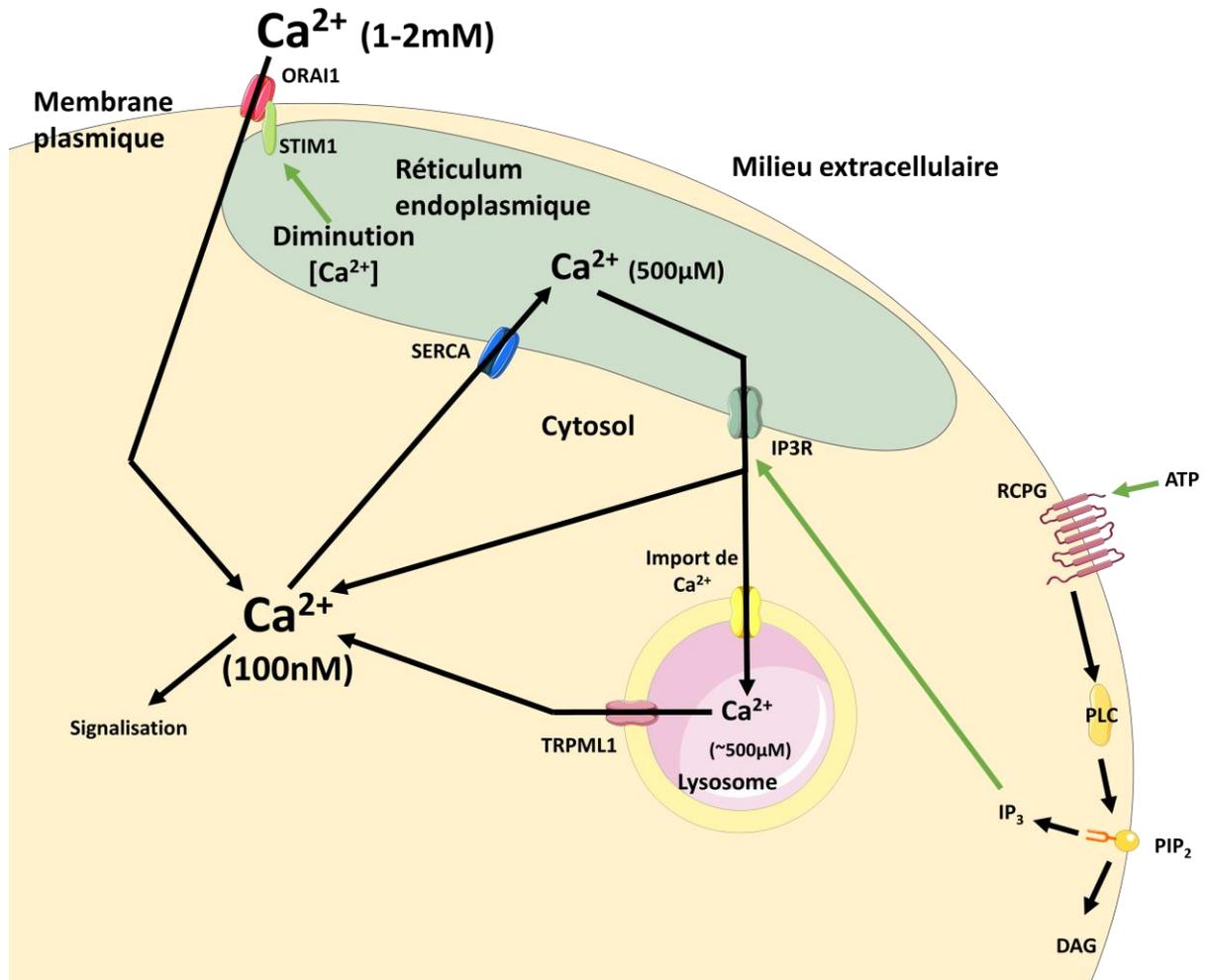


Figure 36 : Schéma simplifié de la régulation des taux de  $\text{Ca}^{2+}$  dans une cellule eucaryote classique. Pour une plus grande simplicité uniquement les compartiments cellulaires étudiés au cours de cette thèse sont représentés ici (cytoplasme, RE et lysosome). Le RE est le réservoir principal de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la cellule. Le RE capte du  $\text{Ca}^{2+}$  par l'action des pompes SERCA et libère du  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cytoplasme par l'action des récepteurs à l'IP3 (IP3R) qui sont activés par liaison de l'inositol-tri-phosphate (d'autres canaux de libération du  $\text{Ca}^{2+}$  du RE existent, les récepteurs à la ryanodine). Ce calcium peut-être capté par d'autres organites comme les mitochondries ou les lysosomes. Ces derniers participent à la signalisation calcique en libérant du  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cytoplasme. Le mécanisme du SOCE permet à la cellule de capter du  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire en réponse à une diminution des niveaux de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le RE. Cette entrée de calcium est aussi utilisée, comme la libération de  $\text{Ca}^{2+}$  par le RE ou les lysosomes, pour déclencher et réguler des voies de signalisation.

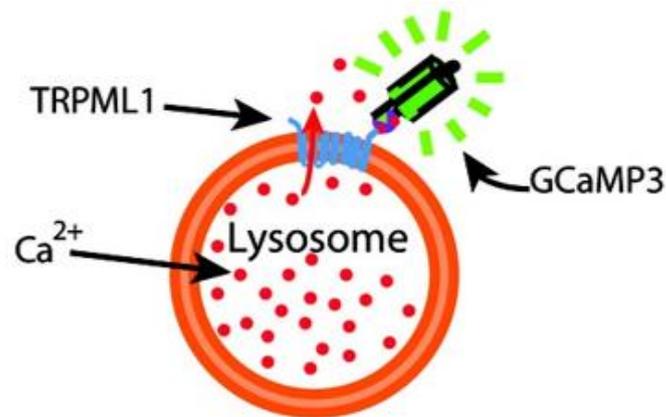
## 2) Résumé :

Le point de départ de l'étude était donc l'observation d'une augmentation du nombre et de la taille des zones de contact entre le réticulum endoplasmique et la membrane plasmique. Puisque ces contacts sont fortement impliqués dans l'import de calcium extracellulaire par le SOCE (Saheki and De Camilli, 2017) j'ai mesuré l'import de calcium par ce processus. J'ai ainsi mis en évidence une augmentation de l'import de  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire par le SOCE. L'utilisation de la microscopie TIRF (total internal reflection fluorescence), sur des cellules exprimant la protéine STIM1 fusionnée à la mcherry, m'a permis de mettre en évidence que le processus du SOCE semble activé dans des conditions basales pour les cellules *Spg11<sup>-/-</sup>* et que l'inactivation du SOCE est fortement réduite dans ces cellules. La dissociation des oligomères STIM1, qui intervient une fois l'import de calcium effectué, est altérée en absence de spatacsine ce qui pourrait conduire à l'augmentation de l'import de calcium mesuré.

Un import trop important, ou mal régulé, de calcium par le SOCE pourrait conduire à une augmentation des taux de calcium dans certains compartiments et en particulier dans le cytosol. Les niveaux de calcium dans le cytosol sont soumis à une importante régulation parce qu'une concentration en calcium trop importante est toxique. Les cellules *Spg11<sup>-/-</sup>* ont une concentration en calcium dans le cytosol légèrement, mais significativement, augmentée. Cette augmentation peut être corrigée en inhibant l'import de calcium extracellulaire suggérant que l'augmentation du SOCE cause l'augmentation en calcium dans le cytosol.

Comme la fonction des lysosomes est perturbée en absence de spatacsine et que la régulation des taux de calcium dans les lysosomes est modifiée dans plusieurs MSL (Lloyd-Evans and Platt, 2011) j'ai mesuré les niveaux de calcium dans les lysosomes des fibroblastes *Spg11<sup>-/-</sup>*. L'utilisation de deux méthodes complémentaires a permis de mettre en évidence que les lysosomes des cellules mutantes contiennent plus de calcium que ceux des cellules sauvages. Cette augmentation pourrait résulter d'une diminution de l'activité d'un canal de libération du calcium lysosomal. J'ai mesuré la libération de calcium par le canal TRPML1, dont la perte de fonction induit une MSL avec accumulation de lipides dans les lysosomes (Bach, 2001), en faisant exprimer par les cellules une protéine TRPML1 couplée à un rapporteur calcique (GCaMP3- TRPML1) qui permet la mesure du calcium libéré à proximité immédiate du canal TRPML1 (Shen et al., 2012) (Figure 37). J'ai induit la libération de calcium par TRPML1 en utilisant un agoniste synthétique du canal : le ML-SA1 (Feng et al., 2014). Alors que les lysosomes contiennent plus de calcium en absence de spatacsine, les cellules mutantes ont une libération de calcium lysosomal par TRPML1 qui est moins importante et plus lente. Ces résultats suggèrent que l'augmentation des taux de calcium dans les lysosomes des fibroblastes

murins embryonnaires *Spg11*<sup>-/-</sup> pourrait provenir d'une altération de la libération de calcium par les lysosomes.



**Figure 37 : Représentation schématique de la construction GCaMP3- TRPML1. Le rapporteur calcique GCaMP3 dont la fluorescence augmente par la liaison du Ca<sup>2+</sup> est fusionné au canal TRPML1 et permet d'évaluer la libération de Ca<sup>2+</sup> par la protéine (Garrity et al., 2016).**

Des défauts de la fonction de TRPML1 sont associés à des accumulations de lipides dans les lysosomes. Ainsi j'ai cherché à identifier quelles espèces lipidiques s'accumulent dans les lysosomes des fibroblastes *Spg11*<sup>-/-</sup>. Dans les neurones, les lipides qui s'accumulent majoritairement sont des gangliosides. Toutefois, ces espèces lipidiques sont peu présentes dans les fibroblastes en comparaison aux neurones en culture suggérant que d'autres espèces lipidiques pourraient s'accumuler dans les fibroblastes. Les lysosomes des cellules *Spg11*<sup>-/-</sup> sont concentrés autour du noyau. Un tel phénotype a été reporté en cas d'accumulation de cholestérol dans les lysosomes (Li et al., 2016; Rocha et al., 2009). J'ai donc réalisé des co-marquages des lysosomes avec l'anticorps anti-Lamp1 et du cholestérol avec la filipine, une molécule fluorescente qui lie le cholestérol, ou le GFP-D4 qui est constitué du domaine D4 de la perfringolysin O qui lie le cholestérol couplé à une GFP (Maekawa et al., 2016). Ces expériences mettent en évidence que la proportion de cholestérol intracellulaire qui est contenue dans les lysosomes est plus importante dans les cellules mutantes. Le traitement des cellules, sauvages comme mutantes, avec le ML-SA1 qui induit la libération de calcium des lysosomes permet de réduire la proportion de cholestérol dans les lysosomes. L'inhibition du SOCE induit des résultats similaires, mais uniquement chez les cellules *Spg11*<sup>-/-</sup>. Ce résultat suggère que les accumulations de cholestérol dans les lysosomes sont une conséquence d'une altération de l'import de calcium par le SOCE ainsi que d'une diminution de la libération de calcium lysosomal.

L'accumulation de cholestérol dans les lysosomes pourrait indiquer une perturbation du trafic du cholestérol des lysosomes vers les autres organites. Le gène *SPG11* a d'ailleurs été identifié comme

impliqué dans le trafic du cholestérol des lysosomes jusqu'à la membrane plasmique dans une étude utilisant un criblage par une librairie d'ARN interférent (Chu et al., 2015). Nous avons donc étudié si l'absence de spatacsine pourrait perturber le trafic du cholestérol des lysosomes vers la membrane plasmique. J'ai dans un premier temps mesuré les niveaux de cholestérol à la membrane plasmique par dosage enzymatique et par marquage du cholestérol de la membrane plasmique. Ces deux techniques montrent que la perte de fonction de la spatacsine induit une diminution du niveau de cholestérol à la membrane plasmique. Pour confirmer que cette diminution est la conséquence d'une altération du trafic des lysosomes, j'ai mis les cellules en présence d'un LDL contenant du cholestérol fluorescent (Kanerva et al., 2013) et j'ai mesuré la colocalisation entre ce cholestérol fluorescent et les lysosomes. Dans les cellules sauvages et mutantes la colocalisation augmente de manière similaire au cours des premières heures, indiquant que l'internalisation des LDL n'est pas altérée. Pour des temps plus longs la colocalisation entre le cholestérol et les lysosomes diminue dans les cellules sauvages mais pas dans les cellules *Spg11<sup>-/-</sup>*, ce qui suggère que le transfert du cholestérol des lysosomes vers les autres organites est perturbé dans ces cellules.

Enfin, comme la perte de fonction de la spatacsine est responsable de dysfonctions du recyclage des lysosomes et qu'une altération de l'homéostasie calcique peut avoir des conséquences très importantes sur de nombreuses fonctions cellulaires nous avons émis l'hypothèse que l'import de calcium plus important par le SOCE pourrait contribuer aux dysfonctions des lysosomes. L'inhibition du SOCE permet de corriger les accumulations d'autolysosomes dans les cellules *Spg11<sup>-/-</sup>* et restaure partiellement la tubulation des lysosomes dans ces cellules. Ces résultats suggèrent que les accumulations de lipides dans les lysosomes et les problèmes dans le recyclage des lysosomes présents en cas de perte de fonction de la spatacsine sont en partie causés par une altération de l'homéostasie calcique et en particulier par une augmentation de l'import de calcium par le SOCE qui induit une augmentation des niveaux de calcium dans le cytosol et possiblement dans les lysosomes.

### **3) Article 3 :**

**Store operated calcium entry contributes to lysosomal accumulation of cholesterol**



# Store operated calcium entry contributes to lysosomal accumulation of cholesterol

## Authors and affiliations:

Maxime Boutry<sup>1-5</sup>, Raphaël Matusiak<sup>1-4</sup>, Julien Branchu<sup>1-4</sup>, Yoan Ibrahim<sup>1-4</sup>, Khalid-Hamid El Hachimi<sup>1-5</sup>, Alexis Brice<sup>1-4</sup>, Giovanni Stevanin<sup>1-6</sup>, Frédéric Darios<sup>1-4</sup>

1: Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, UMR S 1127, F-75013, Paris, France

2: Inserm, U1127, F-75013, Paris, France

3: CNRS, UMR 7225, F-75013, Paris, France

4: Institut du Cerveau et de la Moelle épinière, ICM, F-75013, Paris, France

5: Ecole Pratique des Hautes Etudes, PSL Research University, Laboratoire de Neurogénétique, F-75013, Paris, France

6: Centre de référence de Neurogénétique, Fédération de génétique, APHP, La Pitié-Salpêtrière Hospital, F-75013, Paris, France

## Correspondence: Frédéric Darios

Institut du Cerveau et de la Moelle épinière

INSERM U1127, CNRS UMR 7225, UPMC UMR S 1127

Hôpital de la Salpêtrière

47, boulevard de l'hôpital

F-75013 France

Tel: (+33) 1 57 27 46 52

Fax : (+33) 1 57 27 46 95

E-mail: [frederic.darios@upmc.fr](mailto:frederic.darios@upmc.fr) (F.D.)

**Abstract:**

Mutations in *SPG11* account for the most frequent form of autosomal recessive form of hereditary spastic paraplegias. The product of *SPG11*, spatacsin, has been proposed to play a role in the initiation autophagic lysosome reformation, a cellular process allowing recycling of lysosomal membrane after termination of autophagy. However, the molecular role of spatacsin in this cellular process is still unknown. Here we show that loss of spatacsin led to increased levels of calcium in lysosomes and cytosol. We show that the increase in cytosolic calcium levels is the consequence of higher store-operated calcium entry (SOCE), a mechanism allowing replenishment of the endoplasmic reticulum calcium store when it is depleted. Higher SOCE was responsible for the accumulation of cholesterol in lysosomes and accumulation of autolysosomes. Furthermore, we demonstrate that correction of calcium homeostasis partially restored functional autophagic lysosome reformation. Our work therefore identifies calcium homeostasis as a key regulator of lipid metabolism in lysosomes, and suggest that spatacsin may play a role way upstream from initiation of autophagic lysosome recovery.

**Introduction:**

Hereditary Spastic Paraplegias (HSP) constitute the second most frequent group of motor neuron diseases characterized by progressive bilateral weakness, spasticity and loss of vibratory sense in the lower limbs. These symptoms are mainly due to the degeneration of axons of the upper motor neurons of the corticospinal tract (1). In complicated forms of HSP, these symptoms can be associated with a variety of neurological and extraneurological signs (2, 3). SPG11 represents the most common form of autosomal recessive HSP (AR-HSP). Beside the spastic gait disorder, patients can also suffer from mental retardation, peripheral neuropathy, cerebellar ataxia, parkinsonism, and retinal degeneration often associated with progressive thinning of the corpus callosum and white matter hyperintensities at brain magnetic resonance imaging (MRI) (4, 5). *SPG11* encodes a 2,443 amino acid protein, spatacsin.

Loss of spatacsin function impairs lysosomal function. Fibroblasts of SPG11 patients contain enlarged late endosomes or lysosomes (6). This phenotype likely results from the impairment of lysosomal membrane recycling after termination of autophagy (7). Consistently, lysosomes are depleted and autolysosomes accumulates in neurons in a *Spg11* knockout mouse model (8). Furthermore, loss of spatacsin was shown to lead to accumulation of lipids in lysosomes from the early stages of the disease (9). These phenotypes are consistent with a function of spatacsin in lysosomes. However the subcellular localization of spatacsin is still debated; the protein has been localized in various subcellular compartments, including lysosome, endoplasmic reticulum (ER), mitochondria and endosomes (7, 10, 11).

Lysosomes are a subcellular compartment with catabolic activity that is required for cell physiology to degrade or use metabolites imported by endocytosis or to recycle cellular components by the autophagy pathway. However, the lysosomal function is not limited to its degradative activities. Lysosomes also are an intracellular store of calcium (12, 13), an ion that has important role in signaling (14).  $\text{Ca}^{2+}$  concentration in lysosomes is in the range of hundred micromolar (12, 15). Loading of calcium in lysosomes likely requires the activity of the vacuolar  $\text{H}^{+}$ -ATPase, although this is still debated and the molecular nature of transporter is still unknown (12, 16). The release of calcium by lysosomes has been proposed to rely on the mucolipin/TRPML channels and two-pore channels (17). Mutations in TRPML1 are responsible for a lysosomal storage disorder, mucopolipidosis type IV (18-20), linking the calcium homeostasis of lysosomes to their degradative activity. Alteration in lysosomal calcium content was

proposed to contribute to accumulation of cholesterol in models of Niemann Pick type C, even if the underlying mechanisms are still not fully identified (20, 21).

Here we show that lysosomal dysfunction in *Spg11* knockout cells is caused by an alteration of the cellular calcium homeostasis. Indeed, we demonstrate that absence of spatacsin increases not only lysosomal calcium levels, but also cytoplasmic calcium by enhancing store-operated calcium entry (SOCE), a mechanism allowing import of extracellular calcium to replenish intracellular calcium stores such as ER (22). Reduction of SOCE in *Spg11* knockout cells prevented accumulation of cholesterol in lysosomes, allowing the lipid to be trafficked to other cellular compartments. Furthermore, we demonstrate that correction of calcium homeostasis partially restored functional autophagic lysosome reformation and prevented the accumulation of autolysosomes. Our work therefore identifies calcium homeostasis as a key regulator of lipid metabolism in lysosomes.

## Results:

We recently demonstrated that loss of spatacsin function leads to accumulation of lipids in lysosomes in the cortex of 2 month-old mice, and this correlated with the progression of neurodegeneration (9). In the same preparations, we also observed by electron microscopy that loss of spatacsin increased the number and the size of the contacts between ER and plasma membrane (Fig. 1A-C). Such close contacts play a role in transfer of lipids between the membranes, or in homeostasis of calcium (23). Upon depletion of the intracellular calcium store of ER, the ER calcium sensor STIM1 oligomerizes and interact with the plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$  channel Orai1, forming close contacts between the ER and the plasma membrane and allowing import of extracellular calcium to restore normal intracellular calcium homeostasis (24). This mechanism is known as store-operated calcium entry (SOCE).

### **Store-operated calcium entry is increased in *Spg11*<sup>-/-</sup> cells**

We tested whether loss of spatacsin changed the SOCE. We treated fibroblasts in a  $\text{Ca}^{2+}$ -free medium with the SERCA inhibitor thapsigargin to deplete endoplasmic reticulum calcium store. We then added calcium in extracellular medium at 2 mM to trigger SOCE. Import of  $\text{Ca}^{2+}$  influx was measured using cytosolic calcium probe Fura-2. *Spg11*<sup>-/-</sup> cells imported more extracellular calcium than *Spg11*<sup>+/+</sup> cells (Fig. 1D). To confirm this data, we monitored the proximity of the ER calcium sensor STIM1 with the plasma membrane by Total Internal Reflection Fluorescence (TIRF). Cells were transfected with a vector allowing expression of STIM1-mCherry. TIRF microscopy performed on fibroblasts in basal conditions showed that the proportion of plasma membrane in close contact with the ER calcium sensor is higher in *Spg11*<sup>-/-</sup> cells (Fig. 1E-F). This suggests that loss of spatacsin promoted SOCE in basal conditions.

To evaluate the role of spatacsin in this process, we followed the kinetics of formation or dissociation of contacts between ER and plasma membrane by monitoring the proximity of the ER protein STIM1 with the plasma membrane by TIRF microscopy. The kinetics of the formation of contacts was monitored following treatment of cells with thapsigargin that depletes calcium from the ER and thus promotes formation of STIM1-Orai1 clusters (24). The kinetics of formation of contacts between ER and plasma membrane was similar between *Spg11*<sup>+/+</sup> and *Spg11*<sup>-/-</sup> fibroblasts (Fig. 1G). To test the kinetics of dissociation between ER and plasma membrane, we first incubated cells in a calcium free medium

containing 2 mM EGTA for 1 hour that leads to decrease intracellular content of calcium and promote the formation of contact between plasma membrane et ER labeled with STIM1 (Fig. 1H). Then we added back 2mM extracellular free  $Ca^{2+}$  in the medium and we followed the kinetics of dissociation of the contact between ER and plasma membrane. Wild types cells showed a reduction of STIM1-mcherry fluorescence at the plasma membrane indicating an efficient STIM1 clusters dissociation. In contrast, STIM1 clusters dissociation in *Spg11<sup>-/-</sup>* cells was extremely impaired (Fig. 1. H-I).

### **Loss of spatacsin increases cytosolic calcium levels**

SOCE promotes the entry of extracellular calcium that is normally taken up by ER (22, 24). We monitored whether the increased SOCE due to loss of spatacsin modified the cytosolic calcium levels in resting cells. Calcium levels were measured using the Fura-2 probe and a calibration protocol. Cytosolic calcium levels were slightly, but significantly increased in *Spg11<sup>-/-</sup>* fibroblasts compared to *Spg11<sup>+/+</sup>* cells (Fig. 2A). To test whether this increase in cytosolic calcium was a consequence of increased SOCE, we reduced extracellular calcium levels to 0.4 mM by adding EGTA to culture medium for 1 hour. In these conditions, SOCE was strongly decreased both in *Spg11<sup>+/+</sup>* and *Spg11<sup>-/-</sup>* fibroblasts (data not shown) and resting cytosolic calcium levels in *Spg11<sup>-/-</sup>* and *Spg11<sup>+/+</sup>* fibroblasts were decreased (Fig. 2B). To confirm this result, we downregulated expression of STIM1 by transfecting fibroblasts with specific siRNA (Fig. 2C). Downregulation of STIM1 decreased SOCE and restored normal cytosolic calcium levels in *Spg11<sup>-/-</sup>* cells (Fig. 2D-E), demonstrating that enhanced SOCE results in increased cytosolic calcium levels in absence of spatacsin.

### **Loss of spatacsin increases lysosomal calcium levels**

Loss of spatacsin impairs the normal function of lysosomes (6, 7). We therefore monitored whether it affected the calcium levels in lysosomes. To determine calcium levels in lysosomes, we used Oregon Green BAPTA-Dextran to directly monitor lysosomal calcium levels. Cells were incubated with Oregon Green BAPTA-Dextran and Rhodamine-dextran for 18 hours, allowing the dyes to enter lysosome lumen after endocytosis. Oregon Green BAPTA is pH sensitive (15), but it was suitable to monitor the consequence of loss of spatacsin on lysosomal calcium as the pH of lysosomes was identical in *Spg11<sup>-/-</sup>* fibroblasts than in *Spg11<sup>+/+</sup>* fibroblasts (9). Measurement of Oregon Green BAPTA

fluorescence showed that lysosomal calcium was higher in *Spg11*<sup>-/-</sup> fibroblasts than in control fibroblasts (Fig. 3A).

To confirm these data, we monitored cytosolic calcium levels with Fura-2 and promoted the release of calcium from lysosomes by addition of glycyl-L-phenylalanine-beta-naphthylamide (GPN), a peptide hydrolyzed in lysosomes by cathepsin C promoting their osmotic lysis and releasing their content (21). When GPN was added to cells, we observed an increase in cytosolic calcium levels. The increase was higher in *Spg11*<sup>-/-</sup> fibroblasts than in *Spg11*<sup>+/+</sup> fibroblasts suggesting that lysosomal calcium was higher in absence of spatacsin (Fig. 3B). In this experiment, calcium was monitored by the cytosolic probe Fura-2. To monitor only the calcium released by lysosomes, we expressed in fibroblasts the calcium sensor GCaMP3 fused to TRPML1 (20). Treatment with GPN induced a higher calcium signal in *Spg11*<sup>-/-</sup> fibroblasts than in *Spg11*<sup>+/+</sup> fibroblasts confirming that lysosomal calcium levels were higher in absence of spatacsin (Fig. 3C-D).

Then we investigated whether the activity of the TRPML1 calcium channel could explain the difference in calcium levels between *Spg11*<sup>-/-</sup> and *Spg11*<sup>+/+</sup> fibroblasts. Cells expressing GCaMP3 fused to TRPML1 were treated with the TRPML1 agonist MLSA-1 to quantify the release of calcium by this channel. Calcium release was lower in *Spg11*<sup>-/-</sup> than in *Spg11*<sup>+/+</sup> fibroblasts (Fig. 3E-F), suggesting that calcium release was slightly impaired in *Spg11*<sup>-/-</sup> fibroblasts. Higher concentration of calcium in lysosomes of *Spg11*<sup>-/-</sup> cells could be a consequence of impaired calcium release by the TRPML1 channel.

### **Increased SOCE is responsible for cholesterol accumulation in lysosomes**

Impaired calcium release by TRPML1 leads to lysosomal dysfunction (20). Accordingly, we previously demonstrated that absence of spatacsin leads to accumulation of lipids in lysosomes in cultured fibroblasts (9). To decipher the cellular alterations leading to pathology we wanted to identify some of the lipids species that accumulate in lysosomes of *Spg11*<sup>-/-</sup> cells. Interestingly spatacsin deficient cells showed a perinuclear accumulation of LAMP1-positive vesicles (Fig. 4A-B), a phenotype that has been linked to accumulation of cholesterol in late endosomes or lysosomes (25, 26). We thus hypothesized that cholesterol might accumulate in late endosomes/lysosomes of *Spg11*<sup>-/-</sup> fibroblasts. We monitored intracellular localization of cholesterol with filipin that stains free cholesterol, or the fluorescent probe derived from perfringolysin-O, GFP-D4 (27). The mean fluorescence intensity of filipin

staining on whole cells was the same in *Spg11<sup>+/+</sup>* and *Spg11<sup>-/-</sup>* fibroblasts (Fig. 4C, 4E), a result confirmed by a biochemical analysis of cellular cholesterol content (Fig. 4F). However, the proportion of cholesterol colocalized with late endosomes/lysosomes was increased in *Spg11<sup>-/-</sup>* fibroblasts compared to control cells (Fig. 4D). Similar results were obtained with GFP-D4 probe (data not shown).

We then tested whether cholesterol accumulation was caused by impaired calcium homeostasis. We treated fibroblasts with the TRPML1 synthetic agonist ML-SA1 to decrease lysosomal calcium. Decreasing calcium levels in lysosomes decreased the amount of cholesterol in lysosomes both in *Spg11<sup>+/+</sup>* and *Spg11<sup>-/-</sup>* fibroblasts (Fig. 4G). Then, we investigated the role of increased SOCE on cholesterol accumulation in lysosomes. When we decreased SOCE by reducing extracellular calcium concentration or decreasing STIM1 expression using siRNA, the accumulation of cholesterol in lysosomes observed in *Spg11<sup>-/-</sup>* cells was corrected (Fig. 4H-I). This suggests that accumulation of cholesterol in lysosomes of *Spg11<sup>-/-</sup>* fibroblasts is a consequence of the increase in SOCE and impaired lysosomal calcium homeostasis.

#### **Loss of spatacsin decrease cholesterol export from lysosomes**

We then investigated whether accumulation of cholesterol in late endosomes/lysosomes changes its concentration in the plasma membrane. We stained cholesterol of the plasma membrane with using the GFP-D4 on live cells, showing that it was significantly decreased in *Spg11<sup>-/-</sup>* cells compared to control cells (Fig. 5A-B). To confirm this result, we determined total and plasma membrane cholesterol by an enzymatic assay. The total amount of cholesterol was the same in *Spg11<sup>-/-</sup>* and *Spg11<sup>+/+</sup>* cells (Fig. 4F), and levels of cholesterol in the plasma membrane were lower in *Spg11<sup>-/-</sup>* than in *Spg11<sup>+/+</sup>* cells (Fig. 5C).

Together these results suggest that cholesterol trafficking in late endosomes/lysosomes might be impaired in absence of spatacsin. To test this hypothesis, we monitored the trafficking of fluorescent-labelled cholesterol. Control and *Spg11<sup>-/-</sup>* fibroblasts were incubated with low density lipoprotein (LDL) loaded with Top-fluor cholesterol for two hours, and chased for 24 hours. We monitored the colocalization of fluorescent cholesterol with LAMP1 at several time points. During the first two hours, the proportion of fluorescent cholesterol colocalized with LAMP1 increased, consistent with the internalization of LDL. No difference in the internalization of LDL was observed between *Spg11<sup>+/+</sup>* and *Spg11<sup>-/-</sup>* fibroblasts. For longer chase time, we observed in control cells a progressive decrease in

colocalization between fluorescent cholesterol and LAMP1, consistent with the exit of cholesterol from late endosomes or lysosomes (28). In contrast, in *Spg11*<sup>-/-</sup> cells, this proportion remained stable (Fig. 5C), suggesting that efflux of cholesterol from late endosomes/lysosomes was altered in absence of spatacsin.

### **Increased SOCE contributes to accumulation of autolysosomes in *Spg11*<sup>-/-</sup> cells**

As a dysregulation of calcium homeostasis could give rise to major cellular dysfunctions we wondered if the alteration of SOCE was involved in autolysosomal defects found in SPG11 cellular and animal models (7, 8). At steady state, the colocalization of the lysosomal marker LAMP1 and the autophagosome marker p62 was higher in *Spg11*<sup>-/-</sup> cells than in control cells, consistent with the proposed accumulation of autolysosomes in the absence of spatacsin (Fig. 6A-B). When SOCE was decreased by reducing extracellular calcium concentration or downregulating STIM1 expression levels using siRNA, the proportion of autolysosomes was restored in *Spg11*<sup>-/-</sup> fibroblasts (Fig. 6B-C). These results suggest that perturbation of calcium homeostasis contributed to an alteration in autolysosomal pathway. The increase in number of autolysosomes in absence of spatacsin is thought to be caused by an impairment of autophagic lysosome reformation (ALR) a mechanism by which cells generate new lysosomes (7). This process involves a tubulation of LAMP1 positive organelles, a process strongly altered in *Spg11*<sup>-/-</sup> cells. We tested if modulation of SOCE could restore formation of LAMP1 tubules in absence of spatacsin. Cells were transfected with a vector allowing expression of LAMP1-mCherry and tubules were monitored by live imaging. As previously reported, untreated *Spg11*<sup>-/-</sup> fibroblasts showed a strong diminution of LAMP1 tubules in comparison to wild type cells (Fig. 6D-E). Interestingly, decreasing SOCE partially restored tubulation in absence of spatacsin (Fig. 6E) suggesting that altered calcium homeostasis participated to an impaired ALR causing an increase of autolysosome structures in *Spg11*<sup>-/-</sup> cells.

## Discussion

Loss of spatacsin was previously shown to promote accumulation of lipids in lysosomes (9) and to impair lysosome recycling leading to accumulation of autolysosomes (7, 8). Here we show a link between the two phenomena, and demonstrate that they are regulated by an upstream modulation of calcium homeostasis.

In absence of spatacsin, we observed an increase in store operated calcium entry that resulted in higher cytoplasmic calcium concentration. Direct imaging of STIM1, a molecular player in store operated calcium entry, suggests that loss of spatacsin impairs the dissociation of ER from the plasma membrane or the dissociation of STIM1 oligomers after calcium uptake has occurred. This fits with the higher amount of contact sites between ER and plasma membrane that were observed in neurons in the cortex of 2 month old *Spg11<sup>-/-</sup>* mice. Calcium homeostasis is a tightly regulated mechanism (14) and a slight increase in cytosolic calcium in neurons could contribute in the long term to neurodegeneration. Accordingly, increased store operated calcium entry has been shown to contribute to neurodegeneration in mouse models of Huntington's disease (29).

In absence of spatacsin, the total amount of cholesterol is unchanged, consistent with our previous lipidomic data performed on cortices of *Spg11<sup>-/-</sup>* mice (Boutry, in preparation). However, cholesterol accumulates in lysosomes at the expense of other subcellular compartments in absence of spatacsin. Accordingly, spatacsin was found to be involved in cholesterol trafficking from lysosomes to plasma membrane in a shRNA screening (30). Loss of spatacsin is also responsible for accumulation of gangliosides in lysosomes in neuronal models, but it is not clear whether they also accumulate in lysosomes in fibroblasts. Gangliosides are glycosphingolipids that are highly enriched in brain (31, 32), which may explain their accumulation in neurons, but not in fibroblasts. It would also be interesting to investigate whether cholesterol accumulates in lysosomes in neurons of *Spg11<sup>-/-</sup>* mice.

The mechanism leading to accumulation of cholesterol in absence of spatacsin is not clear. Cholesterol is exchanged between late endosomes/lysosomes and other subcellular compartments such as endoplasmic reticulum or peroxisomes (33)(34)(30). The traffic occurs at the levels of close contacts between organelles, depending on the molecular machinery implicated, cholesterol can be exported or imported in the late endosome/lysosome compartment (30)(34). The protein NPC1, implicated in Niemann-Pick type C disease, participates in the transfer of cholesterol from lysosomes to ER (33). Increasing TRPML1 expression or activity was sufficient to restore lysosome trafficking and

reduce lysosomal cholesterol load in cellular models of Niemann Pick Type C (20). The impaired release of lysosomal calcium in *Spg11<sup>-/-</sup>* cells could contribute to accumulation of cholesterol in late endosomes/lysosomes in these cells. Our data also show that decreasing the store operated calcium entry in *Spg11<sup>-/-</sup>* cells prevents the accumulation of cholesterol in lysosomes, suggesting that spatacsin do not play a direct role in late endosome/lysosomes. It would rather regulate the store operated calcium entry by a mechanism that need to be elucidated. The relationship between higher SOCE and higher levels of calcium in lysosomes also need to be investigated.

Loss of spatacsin impairs lysosome recovery after autophagy, and spatacsin was proposed to play a role in the initiation of this process (7). However, the molecular role of spatacsin is still elusive. Here we show that a decrease in store operated calcium entry prevents the accumulation of cholesterol in lysosomes and compensate the impairment of ALR caused by the absence of spatacsin. These data suggest that the impairment of ALR could be a consequence of metabolic blockade in lysosome as it was suggested in models of Fabry disease (35). The role of spatacsin on the regulation of calcium homeostasis could thus indirectly modulate lysosome metabolism and ALR. We can however not exclude that spatacsin also has a direct role on lysosomes.

In conclusion, we demonstrate here that spatacsin plays a role in the regulation of calcium homeostasis, by controlling the store operated calcium entry. The loss of this function of spatacsin contributes to previously described alteration of lysosomal functions: the accumulation of lipids, notably cholesterol, in lysosomes (9) and the accumulation of autolysosomes (7, 8). This highlights the complex regulation of lysosome function, and shows that cellular calcium homeostasis contributes to lysosome lipid metabolism.

## Materials and Methods

**Antibodies and chemicals:** Thapsigargin, filipin,  $\text{CaCl}_2$  and GPN were purchased from Sigma. Antibodies used in the study were: rabbit anti-spatacsin (Protein Tech), mouse anti- $\alpha$ -tubulin (Abcam); rat anti-LAMP1 (Clone 1D4B, Development Studies Hybridoma Bank), mouse anti-p62 (Abcam); rabbit anti-LC3 (Novus Biologicals), chicken anti-GFP (Abcam), mouse anti-v5 (Abcam), goat anti-v5 (Abcam). For immunoblotting, the secondary antibodies were conjugated to horseradish peroxidase (Jackson Laboratories) or fluorochromes (IR-dye 800 or IR-dye 680; LI-COR). Secondary antibodies used for immunofluorescence were from Life Technologies.

**Mouse embryonic fibroblasts culture:** *Spg11<sup>-/-</sup>* mice were described previously (9). Mouse embryonic fibroblasts (MEFs) were prepared using E14.5 embryos obtained from breeding of heterozygous mice. After removing head and inner organs, the body was minced with razor blades and incubated in trypsin 0.25% / EDTA (Gibco) for 30 min at 37°C in presence of 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of DNase (Sigma). Cells were dissociated and grown in DMEM medium (Gibco) supplemented with 10% FBS and 1% penicillin/streptomycin. All experiments were performed between passages 4 to passage 6. At least three independent preparations of fibroblasts were used for each experiment.

**Electron microscopy:** Briefly for electron microscopy study, mice were anaesthetized and sacrificed by intracardiac perfusion with a solution of 4% paraformaldehyde (PFA) in 0.1 M phosphate buffer at pH7.4. Samples from frontal cortex were fixed in 1% glutaraldehyde in same buffer, post-fixed in 2% osmium tetroxide, dehydrated and embedded in Araldite. Ultrathin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate and examined by a Hitachi transmission electron microscope. Images were analyzed using ImageJ.

**Calcium Imaging:** Cells grown in Lab-Tek™ (Nunc) were washed with HCSS buffer (120 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 0.8 mM  $\text{MgCl}_2$ , 15 mM glucose and 20 mM HEPES [pH 7.4]) and were incubated with 2.5 $\mu\text{M}$  Fura-2-AM (Life Technologies) for 30 minutes at room temperature in the dark. Cells were washed with HCSS and incubated 15 min at room temperature to allow for Fura-2 de-esterification. Images were recorded with a Nikon Eclipse Ti-E inverted microscope exciting Fura 2-AM loaded cells

alternately at 340 and 380 nm, and emission at 510 nm was recorded. Conversion of Fura-2 ratios into cytosolic calcium concentration was performed as described by Grynkiewicz and collaborators (36).

**Quantification of lysosomal calcium:** Cells were loaded with 0.1mg/ml Rhodamine dextran and 0.1mg/ml Oregon Green BAPTA-Dextran (Life Technologies) for 18 hours at 37°C. Cells were washed with medium and further incubated for 4 hours at 37°C. Cells were analyzed with an automated ArrayScan XTI microscope (Thermo-Fisher) using a Zeiss™ Axio Z1 Observer microscope with 20x (NA 0.4) LD Plan-Neofluar objectives. Fluorescence of cells was quantified with the General Intensity Measurement protocol. For each cell, the fluorescence of Oregon Green BAPTA-Dextran was normalized by the fluorescence intensity of Rhodamine. For each condition, at least 500 cells were analysed per well. Alternatively, fibroblasts were transfected with a vector allowing expression of the calcium sensor GCaMP3 fused to TRPML1 (20). GCaMP3 fluorescence was monitored with a Nikon Eclipse Ti-E inverted microscope equipped with an ORCA-D2 camera (Hamamatsu).

**Plasmids and Transfection:** MEFs were transfected with the Neon transfection system (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions, using the following parameters: 1350V, 30ms and 1 pulse. For overexpression studies, we used 0.5µg of DNA per  $50 \cdot 10^3$  cells, and analysis was performed 24 hours after transfection. For silencing studies,  $50 \cdot 10^3$  cells were transfected with 100nM of siRNA (Invitrogen) and analyzed 48 hours later. The siRNA sequence was GCAAGGAUGUUAUUAUUGATT.

**Cholesterol staining:** Cells were fixed with 4% PFA for 30min at 22°C. Cells were incubated without prior permeabilization with Filipin (50µg/ml; Sigma) in 10% FBS PBS during two hours at room temperature in the dark. Cells were then processed for immunostaining when required.

Preparation of domain D4 of prefringolysin O fused to GFP (EGFP-D4) was produced and purified as previously described (37). Labelling of total cholesterol was performed by incubating fixed and permeabilized cells with 10 µg/ml recombinant EGFP-D4 for 20 min at 22°C. To label cholesterol of the outer leaflet of the plasma membrane, live cells were incubated with 10µg/mL of EGFP-D4 in PBS at 22°C for 15 minutes after PBS washing. Cells were then fixed with 4% paraformaldehyde for 20 minutes and processed for immunostaining.

**Immunofluorescence:** After fixation with 4% PFA, cells were incubated with PBS containing 10mM NH<sub>4</sub>Cl for 10 min at 22°C to quench autofluorescence. Cells were incubated with a solution of 5%BSA/0.1%Triton X-100 in PBS for 30min at 22°C and then with primary antibodies in 5% BSA/0.1% Triton X-100 in PBS overnight at 4°C. After washing, the cells were incubated with the secondary antibodies for 45 minutes at room temperature, and mounted in Prolong Gold reagent (Thermo Scientific). Images were acquired with a Zeiss upright microscope equipped with a Plan-APOCHROMAT objective (63X; NA: 1.4) allowing acquisition of optical sections images.

**Cholesterol measurement:** Cells cultured 24h in 60mm petri dishes were harvested and were lysed by incubation in 100 mM NaCl, 10 mM Tris HCl pH 7.4, 1 mM EGTA, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1% Triton X-100 and Halt™ Protease Inhibitor Cocktail (Thermo Scientific) for 30 minutes at 4°C. Total cellular cholesterol concentration was measured using Amplex® Red Cholesterol Assay Kit (Thermo Scientific). The values were normalized to total cellular protein concentration which was calculated by performing a BCA assay (Thermo Scientific).

To measure cholesterol content of the plasma membrane, we used a protocol modified from (30). In brief, cells were cultured 24h in 60mm petri dishes and then were extensively washed with ice-cold assay buffer (310 mM sucrose, 1mM MgSo<sub>4</sub>, 0,5mM Sodium phosphate [pH 7.4]) followed by an incubation in presence or in absence of 1U/mL cholesterol oxidase for 3min at room temperature. The buffer was removed and cells were washed once with ice-cold assay buffer. Cells were lysed and cholesterol concentration was measured as described above. Plasma membrane cholesterol concentration was calculated by subtracting intracellular cholesterol (cells incubated with cholesterol oxidase) from total cholesterol (cells incubated in absence of cholesterol oxidase). The values were normalized to total cellular protein concentration determined with BCA assay.

**Cholesterol trafficking:** 1 mg of unlabeled LDL from human plasma (Thermo Scientific) were incubated with 50nmoles of Top fluor cholesterol (Avanti Polar Lipids) for 2 hours at 40°C, and were dialysed overnight in PBS-EDTA 1mM overnight. LDL-deprived serum was prepared as described previously (38). Cells were cultured in medium prepared with LDL-deprived serum for 24 hours. To monitor cholesterol trafficking, LDL complexed with Top Fluor Cholesterol were added to cells for two hours.

Cells were washed with culture medium and fixed with PFA 4% after different time of incubation in LDL free medium.

**Western blot analysis:** Cells were lysed in 100 mM NaCl, 10 mM Tris HCl pH 7.4, 1 mM EGTA, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1% Triton X-100 and Halt™ Protease Inhibitor Cocktail (Thermo Scientific) for 15 minutes at 4°C. Lysates were cleared by a 15 minute centrifugation at 16,000g at 4°C. Protein concentration was determined with the BCA assay kit. Western blots were performed as described previously (39). Signals were visualized with a chemiluminescence substrate (SuperSignal West Dura), or acquired with an Odyssey CIX (Li-COR). Signal intensities were quantified with ImageJ software.

**Total Internal Reflection Fluorescence (TIRF) microscopy:** TIRF experiments were performed in fibroblasts transfected with vectors allowing expression of STIM1-mCherry, using a previously described protocol (40). Analyses were performed using ImageJ software. TIRF signal was obtained by thresholding, and for each cell the area containing TIRF signal was normalized to the cellular surface. To analyze the kinetics of dissociation of STIM1-mCherry clusters, the cells were incubated for 1hr in culture medium containing 4mM of EGTA to reduce extracellular calcium concentration virtually to  $8 \cdot 10^{-8}$  M (<http://maxchelator.stanford.edu/CaEGTA-TS.htm>). TIRF images were then acquired every 5 seconds for 3 minutes. After 20 seconds, calcium was added in the medium to reach an extracellular concentration of 2mM. STIM1-mcherry clusters dissociation was expressed as the ratio between mean fluorescence intensity at each time frame and mean fluorescence intensity before calcium was added.

**Lysosome positioning and tubules:** Position of lysosomes was assessed using imageJ and MATLAB (MathWorks©) softwares. In brief, signals from nucleus (DAPI) and lysosomes (LAMP1) from an optical section were acquired with Apotome 2 microscope (Zeiss). The centroid of the nucleus was determined using DAPI signal and centroids of each lysosomes were determined as the pixel with the highest intensity for each LAMP1 vesicle. The distance between lysosome centroids and the nucleus centroid was calculated. The results were expressed as the relative distance to nucleus with 100 being the distance between the nucleus and the farthest lysosome. For lysosomal tubules, cells expressing LAMP1-mcherry were live imaged at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> using a Leica DMI8 microscope equipped with

a Yokogawa Confocal Spinning Disk module. Cells were chosen randomly with the only criteria that expression levels of LAMP1-mCherry was high enough to detect lysosomal tubules.

**Statistics and data analysis:** All statistical tests were performed with GraphPad Prism 6. Graphs were drawn using Adobe Illustrator CS6 (Adobe).

### **Ethical approval**

The care and treatment of animals followed European legislation (N° 2010/63/UE) and national (Ministère de l'Agriculture, France) guidelines for the detention, use and ethical treatment of laboratory animals. All experiments on animals were approved by the local ethics committee (Ce5/2012/045 approval number) and were conducted by authorized personnel.

## **Acknowledgments**

We thank the *Plateforme d'Imagerie de la Pitié-Salpêtrière* for their contributions. We also thank Merle Ruberg for critical reading of the manuscript and Agnès Rastetter for her help. The 1D4B monoclonal antibody was obtained from the Developmental Studies Hybridoma Bank (University of Iowa, Department of Biology, IA 52242). This work was supported by the “Investissements d’avenir” program [ANR-10-IAIHU-06] and [ANR-11-INBS-0011] grants and received funding from the Verum Foundation (to A.B. and G.S.), the French Agency for Research (ANR) (to G.S.), the *GIS-Maladies Rares* Foundation (to G.S.), the *Fondation Roger de Spoelberch* (to A.B.), and the European Union with the ANR (to A.B., Seventh Framework Programme - FP7, Omics call; to G.S., the E-Rare programme) and the European Research Council (European Research Council Starting [grant No 311149] to F.D.).

## **Conflict of Interest Statement**

The authors have no conflict of interest to declare.

## References

- 1 Harding, A.E. (1983) Classification of the hereditary ataxias and paraplegias. *Lancet*, **1**, 1151-1155.
- 2 Figlewicz, D.A. and Bird, T.D. (1999) "Pure" hereditary spastic paraplegias: the story becomes complicated. *Neurology*, **53**, 5-7.
- 3 Stevanin, G., Ruberg, M. and Brice, A. (2008) Recent advances in the genetics of spastic paraplegias. *Curr Neurol Neurosci Rep*, **8**, 198-210.
- 4 Stevanin, G., Santorelli, F.M., Azzedine, H., Coutinho, P., Chomilier, J., Denora, P.S., Martin, E., Ouvrard-Hernandez, A.M., Tessa, A., Bouslam, N. *et al.* (2007) Mutations in SPG11, encoding spatacsin, are a major cause of spastic paraplegia with thin corpus callosum. *Nat Genet*, **39**, 366-372.
- 5 Hehr, U., Bauer, P., Winner, B., Schule, R., Olmez, A., Koehler, W., Uyanik, G., Engel, A., Lenz, D., Seibel, A. *et al.* (2007) Long-term course and mutational spectrum of spatacsin-linked spastic paraplegia. *Ann Neurol*, **62**, 656-665.
- 6 Renvoise, B., Chang, J., Singh, R., Yonekawa, S., FitzGibbon, E.J., Mankodi, A., Vanderver, A., Schindler, A., Toro, C., Gahl, W.A. *et al.* (2014) Lysosomal abnormalities in hereditary spastic paraplegia types SPG15 and SPG11. *Ann Clin Transl Neurol*, **1**, 379-389.
- 7 Chang, J., Lee, S. and Blackstone, C. (2014) Spastic paraplegia proteins spastizin and spatacsin mediate autophagic lysosome reformation. *J Clin Invest*, **124**, 5249-5262.
- 8 Varga, R.E., Khundadze, M., Damme, M., Nietzsche, S., Hoffmann, B., Stauber, T., Koch, N., Hennings, J.C., Franzka, P., Huebner, A.K. *et al.* (2015) In Vivo Evidence for Lysosome Depletion and Impaired Autophagic Clearance in Hereditary Spastic Paraplegia Type SPG11. *PLoS genetics*, **11**, e1005454.
- 9 Branchu, J., Boutry, M., Sourd, L., Depp, M., Leone, C., Corriger, A., Vallucci, M., Esteves, T., Matusiak, R., Dumont, M. *et al.* (2017) Loss of spatacsin function alters lysosomal lipid clearance leading to upper and lower motor neuron degeneration. *Neurobiol Dis*, **102**, 21-37.
- 10 Murmu, R.P., Martin, E., Rastetter, A., Esteves, T., Muriel, M.P., El Hachimi, K.H., Denora, P.S., Dauphin, A., Fernandez, J.C., Duyckaerts, C. *et al.* (2011) Cellular distribution and subcellular localization of spatacsin and spastizin, two proteins involved in hereditary spastic paraplegia. *Mol Cell Neurosci*, **47**, 191-202.
- 11 Hirst, J., Borner, G.H., Edgar, J., Hein, M.Y., Mann, M., Buchholz, F., Antrobus, R. and Robinson, M.S. (2013) Interaction between AP-5 and the hereditary spastic paraplegia proteins SPG11 and SPG15. *Mol Biol Cell*, **24**, 2558-2569.
- 12 Morgan, A.J., Platt, F.M., Lloyd-Evans, E. and Galione, A. (2011) Molecular mechanisms of endolysosomal Ca<sup>2+</sup> signalling in health and disease. *Biochem J*, **439**, 349-374.
- 13 Lloyd-Evans, E. and Platt, F.M. (2011) Lysosomal Ca(2+) homeostasis: role in pathogenesis of lysosomal storage diseases. *Cell Calcium*, **50**, 200-205.
- 14 Clapham, D.E. (2007) Calcium signaling. *Cell*, **131**, 1047-1058.
- 15 Christensen, K.A., Myers, J.T. and Swanson, J.A. (2002) pH-dependent regulation of lysosomal calcium in macrophages. *J Cell Sci*, **115**, 599-607.
- 16 Garrity, A.G., Wang, W., Collier, C.M., Levey, S.A., Gao, Q. and Xu, H. (2016) The endoplasmic reticulum, not the pH gradient, drives calcium refilling of lysosomes. *Elife*, **5**.
- 17 Xu, H., Martinoia, E. and Szabo, I. (2015) Organellar channels and transporters. *Cell Calcium*, **58**, 1-10.
- 18 Bassi, M.T., Manzoni, M., Monti, E., Pizzo, M.T., Ballabio, A. and Borsani, G. (2000) Cloning of the gene encoding a novel integral membrane protein, mucopolipidin and identification of the two major founder mutations causing mucopolipidosis type IV. *Am J Hum Genet*, **67**, 1110-1120.
- 19 Sun, M., Goldin, E., Stahl, S., Falardeau, J.L., Kennedy, J.C., Acierno, J.S., Jr., Bove, C., Kaneski, C.R., Nagle, J., Bromley, M.C. *et al.* (2000) Mucopolipidosis type IV is caused by mutations in a gene encoding a novel transient receptor potential channel. *Hum Mol Genet*, **9**, 2471-2478.

- 20 Shen, D., Wang, X., Li, X., Zhang, X., Yao, Z., Dibble, S., Dong, X.P., Yu, T., Lieberman, A.P., Showalter, H.D. *et al.* (2012) Lipid storage disorders block lysosomal trafficking by inhibiting a TRP channel and lysosomal calcium release. *Nat Commun*, **3**, 731.
- 21 Lloyd-Evans, E., Morgan, A.J., He, X., Smith, D.A., Elliot-Smith, E., Sillence, D.J., Churchill, G.C., Schuchman, E.H., Galione, A. and Platt, F.M. (2008) Niemann-Pick disease type C1 is a sphingosine storage disease that causes deregulation of lysosomal calcium. *Nat Med*, **14**, 1247-1255.
- 22 Smyth, J.T., Hwang, S.Y., Tomita, T., DeHaven, W.I., Mercer, J.C. and Putney, J.W. (2010) Activation and regulation of store-operated calcium entry. *J Cell Mol Med*, **14**, 2337-2349.
- 23 Saheki, Y. and De Camilli, P. (2017) Endoplasmic Reticulum-Plasma Membrane Contact Sites. *Annu Rev Biochem*, **86**, 659-684.
- 24 Prakriya, M. and Lewis, R.S. (2015) Store-Operated Calcium Channels. *Physiol Rev*, **95**, 1383-1436.
- 25 Li, X., Rydzewski, N., Hider, A., Zhang, X., Yang, J., Wang, W., Gao, Q., Cheng, X. and Xu, H. (2016) A molecular mechanism to regulate lysosome motility for lysosome positioning and tubulation. *Nat Cell Biol*, **18**, 404-417.
- 26 Rocha, N., Kuijl, C., van der Kant, R., Janssen, L., Houben, D., Janssen, H., Zwart, W. and Neefjes, J. (2009) Cholesterol sensor ORP1L contacts the ER protein VAP to control Rab7-RILP-p150 Glued and late endosome positioning. *J Cell Biol*, **185**, 1209-1225.
- 27 Ohno-Iwashita, Y., Shimada, Y., Waheed, A.A., Hayashi, M., Inomata, M., Nakamura, M., Maruya, M. and Iwashita, S. (2004) Perfringolysin O, a cholesterol-binding cytolysin, as a probe for lipid rafts. *Anaerobe*, **10**, 125-134.
- 28 Kanerva, K., Uronen, R.L., Blom, T., Li, S., Bittman, R., Lappalainen, P., Peranen, J., Raposo, G. and Ikonen, E. (2013) LDL cholesterol recycles to the plasma membrane via a Rab8a-Myosin5b-actin-dependent membrane transport route. *Dev Cell*, **27**, 249-262.
- 29 Wu, J., Ryskamp, D.A., Liang, X., Egorova, P., Zakharova, O., Hung, G. and Bezprozvanny, I. (2016) Enhanced Store-Operated Calcium Entry Leads to Striatal Synaptic Loss in a Huntington's Disease Mouse Model. *J Neurosci*, **36**, 125-141.
- 30 Chu, B.B., Liao, Y.C., Qi, W., Xie, C., Du, X., Wang, J., Yang, H., Miao, H.H., Li, B.L. and Song, B.L. (2015) Cholesterol transport through lysosome-peroxisome membrane contacts. *Cell*, **161**, 291-306.
- 31 Sandhoff, K. and Harzer, K. (2013) Gangliosides and gangliosidoses: principles of molecular and metabolic pathogenesis. *J Neurosci*, **33**, 10195-10208.
- 32 Schnaar, R.L. (2016) Gangliosides of the Vertebrate Nervous System. *J Mol Biol*, **428**, 3325-3336.
- 33 Loftus, S.K., Morris, J.A., Carstea, E.D., Gu, J.Z., Cummings, C., Brown, A., Ellison, J., Ohno, K., Rosenfeld, M.A., Tagle, D.A. *et al.* (1997) Murine model of Niemann-Pick C disease: mutation in a cholesterol homeostasis gene. *Science*, **277**, 232-235.
- 34 Wilhelm, L.P., Wendling, C., Vedio, B., Kobayashi, T., Chenard, M.P., Tomasetto, C., Drin, G. and Alpy, F. (2017) STARD3 mediates endoplasmic reticulum-to-endosome cholesterol transport at membrane contact sites. *EMBO J*, **36**, 1412-1433.
- 35 Yu, L., McPhee, C.K., Zheng, L., Mardones, G.A., Rong, Y., Peng, J., Mi, N., Zhao, Y., Liu, Z., Wan, F. *et al.* (2010) Termination of autophagy and reformation of lysosomes regulated by mTOR. *Nature*, **465**, 942-946.
- 36 Grynkiewicz, G., Poenie, M. and Tsien, R.Y. (1985) A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem*, **260**, 3440-3450.
- 37 Abe, M. and Kobayashi, T. (2017) Dynamics of sphingomyelin- and cholesterol-enriched lipid domains during cytokinesis. *Methods Cell Biol*, **137**, 15-24.
- 38 Goldstein, J.L., Basu, S.K. and Brown, M.S. (1983) Receptor-mediated endocytosis of low-density lipoprotein in cultured cells. *Methods Enzymol*, **98**, 241-260.
- 39 Esteves, T., Durr, A., Mundwiller, E., Loureiro, J.L., Boutry, M., Gonzalez, M.A., Gauthier, J., El-Hachimi, K.H., Depienne, C., Muriel, M.P. *et al.* (2014) Loss of association of REEP2 with membranes leads to hereditary spastic paraplegia. *Am J Hum Genet*, **94**, 268-277.

40 Eichel, C.A., Beuriot, A., Chevalier, M.Y., Rougier, J.S., Louault, F., Dilanian, G., Amour, J., Coulombe, A., Abriel, H., Hatem, S.N. *et al.* (2016) Lateral Membrane-Specific MAGUK CASK Down-Regulates Nav1.5 Channel in Cardiac Myocytes. *Circ Res*, **119**, 544-556.

## Legends to Figures

### Figure 1. Loss of spatacsin increases store-operated calcium entry

**A.** Electron micrograph of neurons in the cortex of two month-old *Spg11<sup>-/-</sup>* mouse showing close contact between endoplasmic reticulum (ER) and plasma membrane. False colors highlight the different cellular compartments. Scale bar: 250nm.

**B-C.** Quantification of contacts between ER and plasma membrane defined as zone where the distance between the two membranes is lower than 30nm. **B.** Quantification of the mean length of individual contacts between ER and plasma membrane in the cortex of two month-old *Spg11<sup>-/-</sup>* or *Spg11<sup>+/+</sup>* mouse.

**C.** Quantification of the percentage of plasma membrane in close contact with ER in the cortex of two month-old *Spg11<sup>-/-</sup>* or *Spg11<sup>+/+</sup>* mouse. Graphs represent mean  $\pm$  sem N>23 neurons analyzed in two independent mice for each group. T-test; \*\*\*p<0.0001

**D.** Evaluation of extracellular calcium import by the SOCE. Cytosolic calcium was measured with Fura-2 in absence of extracellular calcium. ER calcium store was depleted with thapsigargin. Addition of 2mM CaCl<sub>2</sub> was added to extracellular medium and the increase in cytosolic calcium measured with Fura-2, allowing quantification of SOCE. Graph represents mean  $\pm$  sem. N>35 cells from 3 independent experiments.

**E.** *Spg11<sup>-/-</sup>* or *Spg11<sup>+/+</sup>* mouse embryonic fibroblasts transfected with vectors allowing expression of STIM1-mCherry imaged by epifluorescence or total internal reflection microscopy (TIRF). Scale bar: 10 $\mu$ m.

**F.** Quantification of the percentage of cellular area with STIM1-mCherry detected by TIRF microscopy indicating close contact between STIM1-mCherry and the plasma membrane. Graph represents mean  $\pm$  sem . N>60 cells in at least three independent experiments. T-test; \*\*\*p<0.0001.

**G.** Kinetics of the increase in the TIRF signal in *Spg11<sup>-/-</sup>* or *Spg11<sup>+/+</sup>* fibroblasts expressing STIM1-mCherry after treatment with thapsigargin. Graph represents mean  $\pm$  sem. N>13 cells from three independent experiments.

**H-I.** Images showing the kinetics of decrease in the TIRF signal after addition of 2mM extracellular CaCl<sub>2</sub> in *Spg11<sup>-/-</sup>* or *Spg11<sup>+/+</sup>* fibroblasts expressing STIM1-mCherry and kept in Ca<sup>2+</sup>-free medium for one

hour. Scale bar: 10 $\mu$ m. I. quantification of the decrease in TIRF signal intensity reported to initial fluorescence. Graph represents mean  $\pm$  sem of 11 (*Spg11<sup>+/+</sup>*) and 7 (*Spg11<sup>-/-</sup>*) cells in at least three independent experiments.

**Figure 2. Higher store operated calcium entry in absence of spatacsin leads to higher cytoplasmic calcium levels.**

**A.** Measure of cytosolic calcium levels in *Spg11<sup>+/+</sup>* or *Spg11<sup>-/-</sup>* fibroblasts. Graphs represent mean  $\pm$  sem. N>180 cells from at least three independent experiments. T-test; \*p=0.048.

**B.** Decrease in 340/380 Fura-2 ratio in *Spg11<sup>+/+</sup>* or *Spg11<sup>-/-</sup>* fibroblasts kept for one hour in a medium containing 0.4mM CaCl<sub>2</sub>. Graphs represent mean  $\pm$  sem. N>170 cells from at least three independent experiments. Two-way ANOVA; \*\*\*p<0.0001.

**C.** Western blot showing the downregulation of STIM1 in *Spg11<sup>+/+</sup>* or *Spg11<sup>-/-</sup>* fibroblasts transfected with siRNA directed against STIM1. Representative image of at least three independent experiments.

**D.** Downregulation of STIM1 strongly abrogates store operated calcium entry in *Spg11<sup>+/+</sup>* or *Spg11<sup>-/-</sup>* fibroblasts. Graphs represent mean  $\pm$  sem. N>55 cells from at least three independent experiments.

**E.** Downregulation of STIM1 restores the 340/380 Fura-2 ratio in *Spg11<sup>-/-</sup>* fibroblasts to the levels of *Spg11<sup>+/+</sup>* fibroblasts. Graphs represent mean  $\pm$  sem. N>55 cells from at least three independent experiments. N>200 cells analyzed in at least three independent experiments. Two-way ANOVA; \*p<0.05; \*\*p<0.01.

**Figure 3. Loss of spatacsin increase lysosomal calcium levels**

**A.** Lysosomal calcium levels in *Spg11<sup>+/+</sup>* or *Spg11<sup>-/-</sup>* fibroblasts, estimated by the fluorescence intensity of the calcium sensor Oregon Green BAPTA-dextran, normalized to the fluorescence of the rhodamine dextran. Graphs represent mean  $\pm$  sem. N=300 cells analyzed in 28 culture wells. T-test; \*\*\*p<0.0001

**B.** Estimation of lysosomal calcium content in *Spg11<sup>+/+</sup>* or *Spg11<sup>-/-</sup>* fibroblasts measured by the release in cytoplasm of calcium following treatment by the peptide GPN. Cytosolic calcium, monitored by the

Fura-2 calcium probe, increased more in *Spg11<sup>-/-</sup>* than *Spg11<sup>+/+</sup>* fibroblasts. Graphs represent mean  $\pm$  sem. N>140 cells analyzed in at least three independent experiments.

**C.** Colocalization of the calcium sensor GCaMP3 fused to TRPML1 with the late endosome/lysosome marker LAMP1 detected by immunostaining. Scale bar: 10 $\mu$ m.

**D.** Evolution of the GCaMP3 fluorescence intensity following treatment of *Spg11<sup>+/+</sup>* or *Spg11<sup>-/-</sup>* fibroblasts with the peptide GPN, indicating that *Spg11<sup>-/-</sup>* fibroblasts release more Ca<sup>2+</sup> than *Spg11<sup>+/+</sup>* fibroblasts. Graphs represent mean  $\pm$  sem. N>50 cells analyzed in at least three independent experiments.

**E.** Evolution of the GCaMP3 fluorescence intensity following treatment of *Spg11<sup>+/+</sup>* or *Spg11<sup>-/-</sup>* fibroblasts with the TRPML1 agonist ML-SA1, showing that Ca<sup>2+</sup> release was more rapid in *Spg11<sup>+/+</sup>* fibroblasts than in *Spg11<sup>-/-</sup>* fibroblasts. Graphs represent mean  $\pm$  sem. N>35 cells analyzed in at least three independent experiments.

**Figure 4. Loss of spatacsin promotes accumulation of cholesterol in late endosomes/lysosomes.**

**A.** Immunostaining of *Spg11<sup>+/+</sup>* or *Spg11<sup>-/-</sup>* fibroblasts with the late endosome/lysosome marker LAMP1. Nuclei are stained with DAPI. White lines indicate the cell periphery. Scale bar: 10 $\mu$ m.

**B.** Distribution of late endosomes/lysosomes in *Spg11<sup>+/+</sup>* or *Spg11<sup>-/-</sup>* fibroblasts. Maximum distance between particles and nucleus was fixed to 100 for each cell. Late endosomes/lysosomes are more clustered around nuclei in *Spg11<sup>-/-</sup>* than *Spg11<sup>+/+</sup>* fibroblasts. Graphs represent mean  $\pm$  sem. N=65 cells in at least three independent experiments

**C.** Staining of cholesterol with filipin and late endosomes/lysosomes by the marker LAMP1 in *Spg11<sup>+/+</sup>* or *Spg11<sup>-/-</sup>* fibroblasts. Insets show a higher magnification of the zone highlighted by a white square. Scale bars: 10 $\mu$ m.

**D.** Quantification of the amount of filipin staining colocalized with the LAMP1 marker, showing a higher amount of cholesterol in late endosomes/lysosomes in *Spg11<sup>-/-</sup>* than *Spg11<sup>+/+</sup>* fibroblasts. Graphs represent mean  $\pm$  sem. N>85 cells in at least three independent experiments. T-test; \*\*\* p<0,0001.

**E.** Quantification of the intensity of filipin staining on whole cells showing no difference in the total amount of cholesterol in *Spg11<sup>+/+</sup>* and *Spg11<sup>-/-</sup>* fibroblasts. Graphs represent mean  $\pm$  sem. N>85 cells in at least three independent experiments. T-test; p= 0.83.

**F.** Biochemical quantification of total cholesterol levels in *Spg11<sup>+/+</sup>* and *Spg11<sup>-/-</sup>* fibroblasts. N=6 independent experiments.

**G.** Treatment of *Spg11<sup>+/+</sup>* or *Spg11<sup>-/-</sup>* fibroblasts with the TRPML1 agonist ML-SA1 (20 $\mu$ M, 1 hour) decreased the amount of cholesterol colocalized with late endosome/lysosome marker. Graphs represent mean  $\pm$  sem. N>45 cells in at least three independent experiments. Two-way ANOVA; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.0001

**H.** Incubation of fibroblasts in a medium containing 0.4mM CaCl<sub>2</sub> for one hour decreased the amount of cholesterol colocalized with late endosome/lysosome marker in *Spg11<sup>-/-</sup>* fibroblasts. Graphs represent mean  $\pm$  sem. N>65 cells analyzed in at least three independent experiments. Two-way ANOVA; \*\*\*p<0.001

**I.** Downregulation of STIM1 decreased the amount of cholesterol colocalized with late endosome/lysosome marker in *Spg11<sup>-/-</sup>* fibroblasts. Graphs represent mean  $\pm$  sem. N>95 cells analyzed in at least three independent experiments. Two-way ANOVA; \*\*\*p<0.001

**Figure 5. Loss of spatacsin impairs export of cholesterol from late endosomes/lysosomes.**

**A.** Staining of live fibroblasts with the GFP-D4 probe allowing staining of plasma membrane cholesterol only. Scale bar: 10 $\mu$ m.

**B.** Quantification of the intensity of GFP-D4 staining performed on live *Spg11<sup>+/+</sup>* and *Spg11<sup>-/-</sup>* fibroblasts, showing a decrease in the level of plasma membrane cholesterol in *Spg11<sup>-/-</sup>* fibroblasts compared to *Spg11<sup>+/+</sup>* fibroblasts. Graphs represent mean  $\pm$  sem. N>95 cells analyzed in at least three independent experiments. T-test; \*\*\* p<0,0001.

**C.** Biochemical quantification of the proportion of cholesterol present in the plasma membrane in *Spg11<sup>+/+</sup>* and *Spg11<sup>-/-</sup>* fibroblasts, showing a decrease in the level of plasma membrane cholesterol in

*Spg11<sup>-/-</sup>* fibroblasts compared to *Spg11<sup>+/+</sup>* fibroblasts. N=6 independent assays. Wilcoxon paired test; \*p=0.031.

**D.** Quantification of the amount of Top-Fluor cholesterol colocalized with the LAMP1 marker in *Spg11<sup>+/+</sup>* and *Spg11<sup>-/-</sup>* fibroblasts over time. Fibroblasts were incubated with LDL loaded with Top-Fluor cholesterol for 2 hours, rinsed, and analyzed after various chase time. Colocalization of Top-Fluor cholesterol with LAMP1 increased in the first four hours in *Spg11<sup>+/+</sup>* and *Spg11<sup>-/-</sup>* fibroblasts. Then the colocalization of Top-Fluor cholesterol with LAMP1 decreased in *Spg11<sup>+/+</sup>* fibroblasts but not in *Spg11<sup>-/-</sup>* fibroblasts. Graphs represent mean  $\pm$  sem. N>95 cells analyzed in at least three independent experiments.

**Figure 6. Increased store operated calcium entry promotes autolysosomes accumulation in absence of spatacsin.**

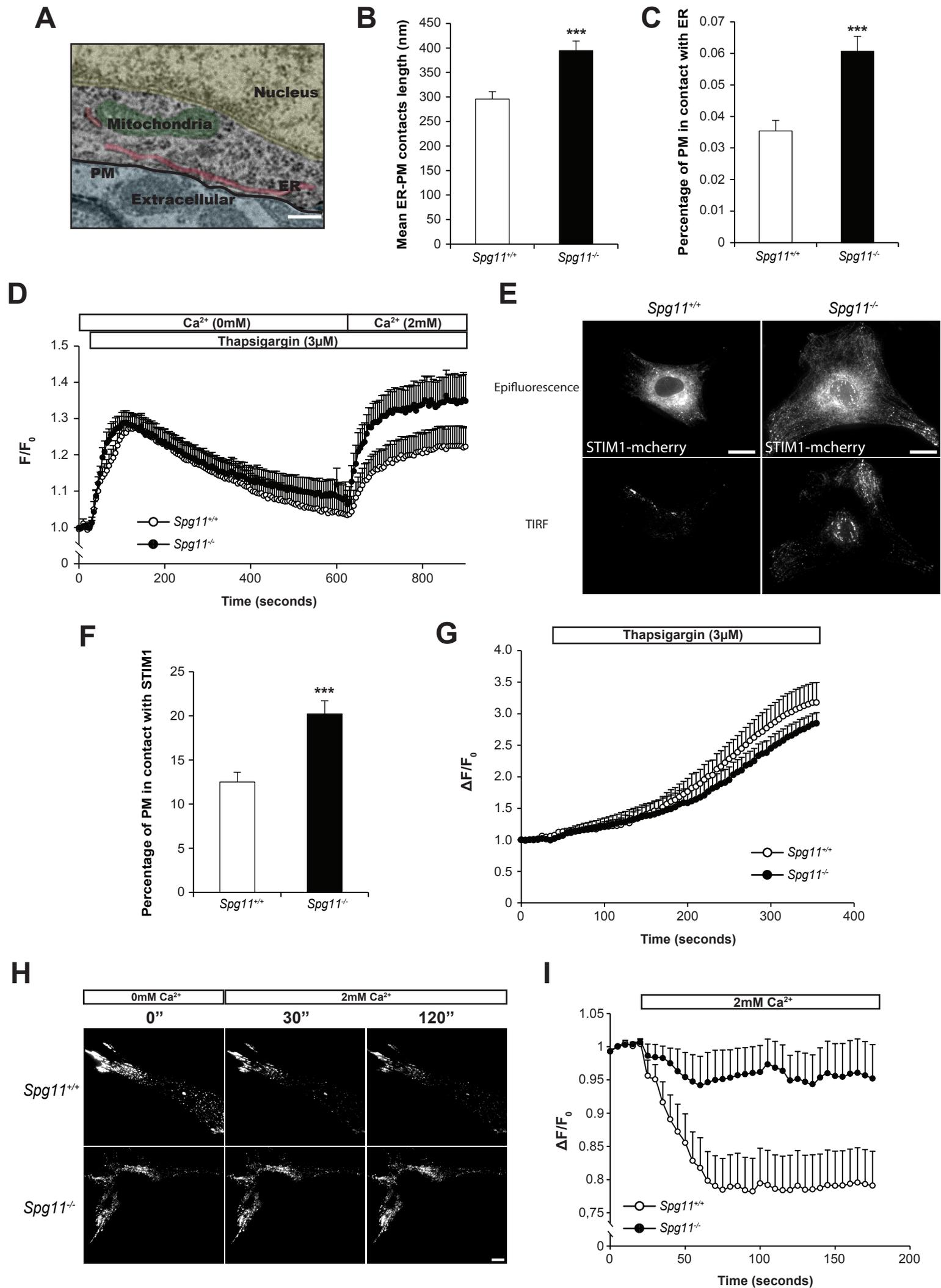
**A.** Immunostaining of the autophagy marker p62 and the late endosome/lysosome marker LAMP1 in *Spg11<sup>+/+</sup>* and *Spg11<sup>-/-</sup>* fibroblasts. Note the higher colocalization of both markers in *Spg11<sup>-/-</sup>* fibroblasts. Scale bar: 10 $\mu$ m.

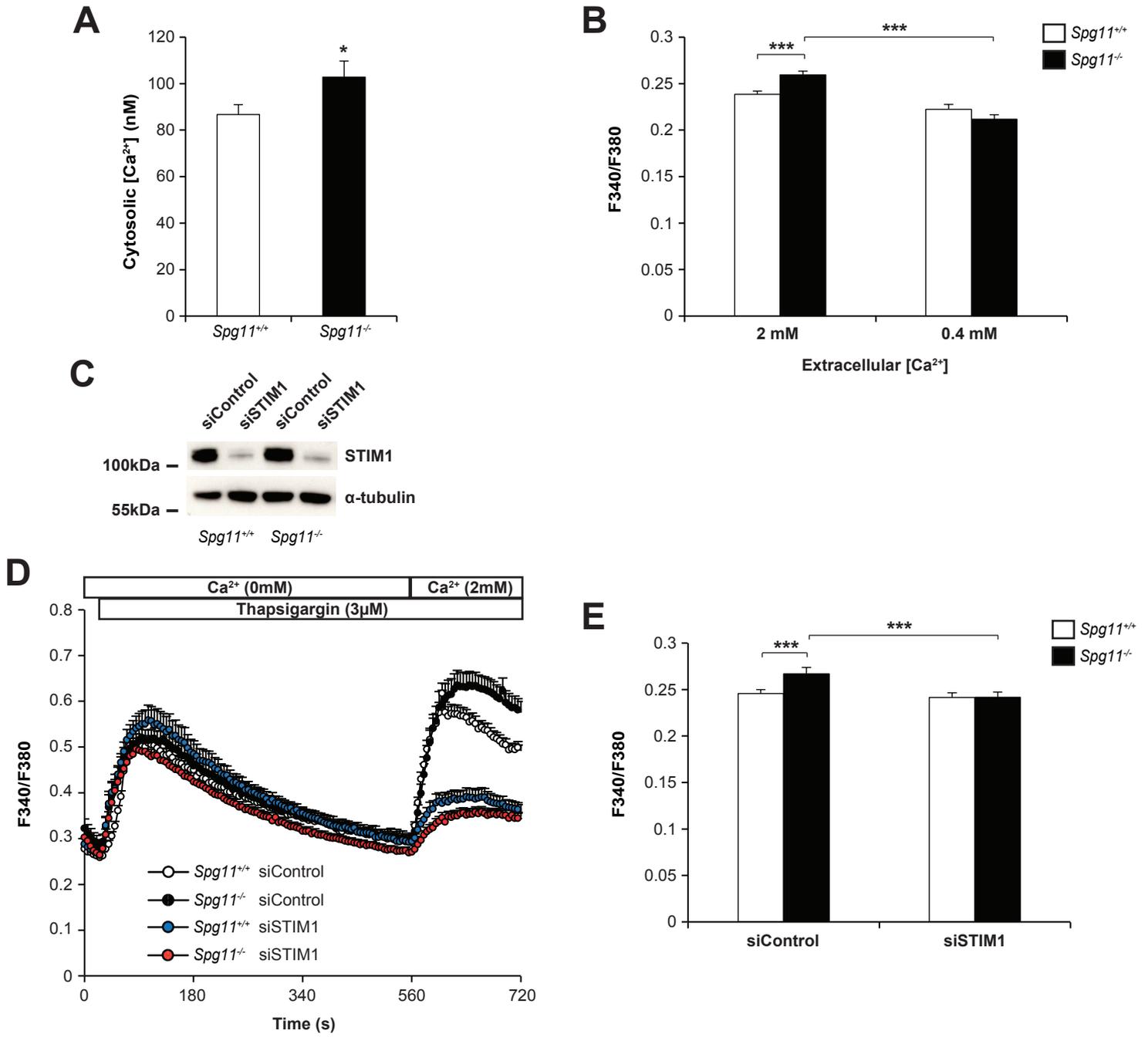
**B.** Quantification of the area occupied by autolysosomes (stained with LAMP1 and p62) normalized to the area of each cell. The area occupied by autolysosomes is higher in *Spg11<sup>-/-</sup>* than *Spg11<sup>+/+</sup>* fibroblasts, and this effect is restored when *Spg11<sup>-/-</sup>* fibroblasts were incubated in a medium containing 0.4mM CaCl<sub>2</sub> for one hour. Graphs represent mean  $\pm$  sem. N>50 cells analyzed in at least three independent experiments. Two-way ANOVA; \*\*\*p<0.001

**C.** Quantification of the area occupied by autolysosomes (stained with LAMP1 and p62) marker in *Spg11<sup>+/+</sup>* and *Spg11<sup>-/-</sup>* fibroblasts transfected with control siRNA or siRNA downregulating STIM1. Downregulation of STIM1 decreased the area occupied by autolysosomes in *Spg11<sup>-/-</sup>* fibroblasts. Graphs represent mean  $\pm$  sem. N>55 cells analyzed in at least three independent experiments. Two-way ANOVA; \*\*\*p<0.001.

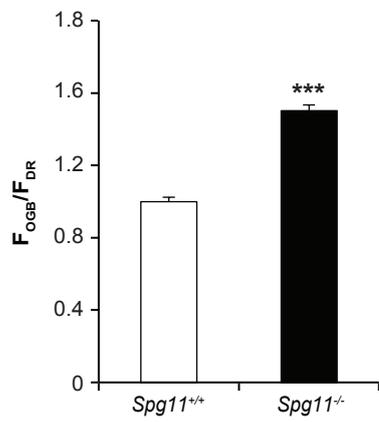
**D.** Live imaging of *Spg11<sup>+/+</sup>* and *Spg11<sup>-/-</sup>* fibroblasts transfected with vector allowing expression of LAMP1 fused to mCherry. Note the presence of tubules (arrowheads in insets) emanating from late endosomes/ lysosomes in *Spg11<sup>+/+</sup>* fibroblasts. Scale Bar: 10 $\mu$ m.

**E.** Quantification of the number of LAMP1-positive tubules per  $\mu$ m<sup>2</sup> in *Spg11<sup>+/+</sup>* and *Spg11<sup>-/-</sup>* fibroblasts. The number of LAMP1-positive tubules is lower in *Spg11<sup>-/-</sup>* than *Spg11<sup>+/+</sup>* fibroblasts, and this number is increased when *Spg11<sup>-/-</sup>* fibroblasts were incubated in a medium containing 0.4mM CaCl<sub>2</sub> for one hour. Graphs represent mean  $\pm$  sem. N>90 cells analyzed in at least three independent experiments. Two-way ANOVA; \* p=0.042; \*\*\* p<0.0001

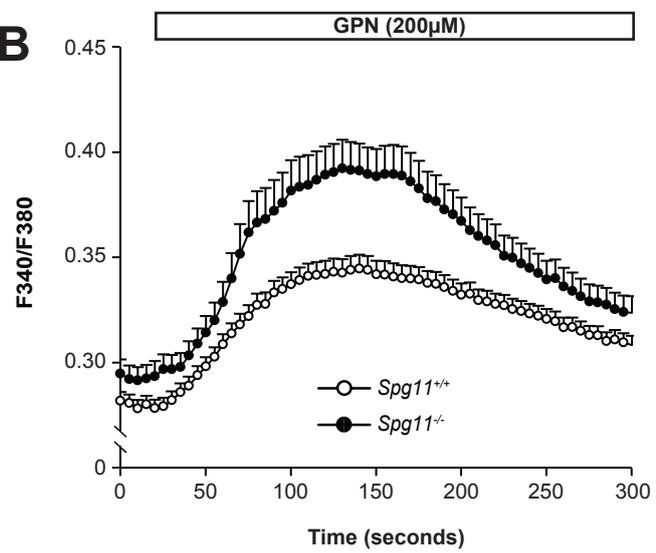




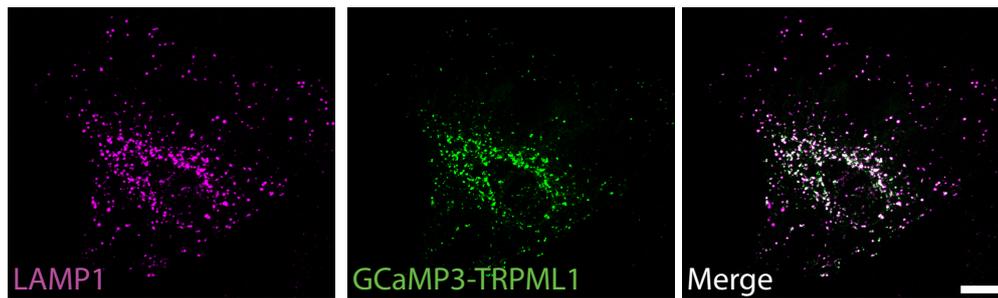
**A**



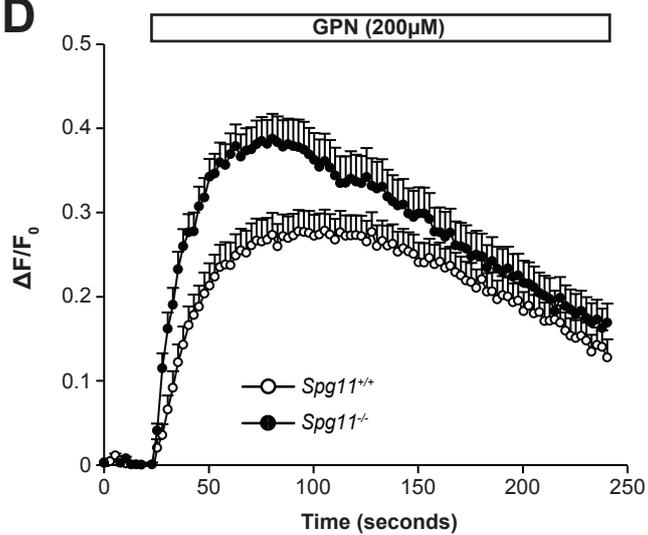
**B**



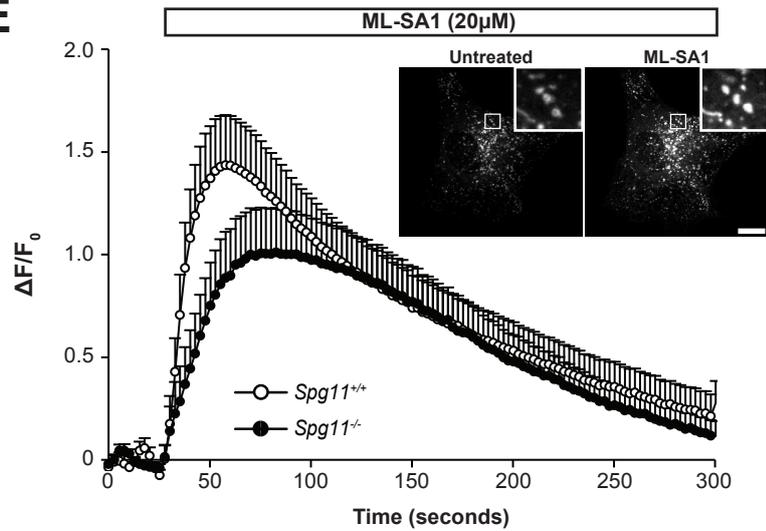
**C**

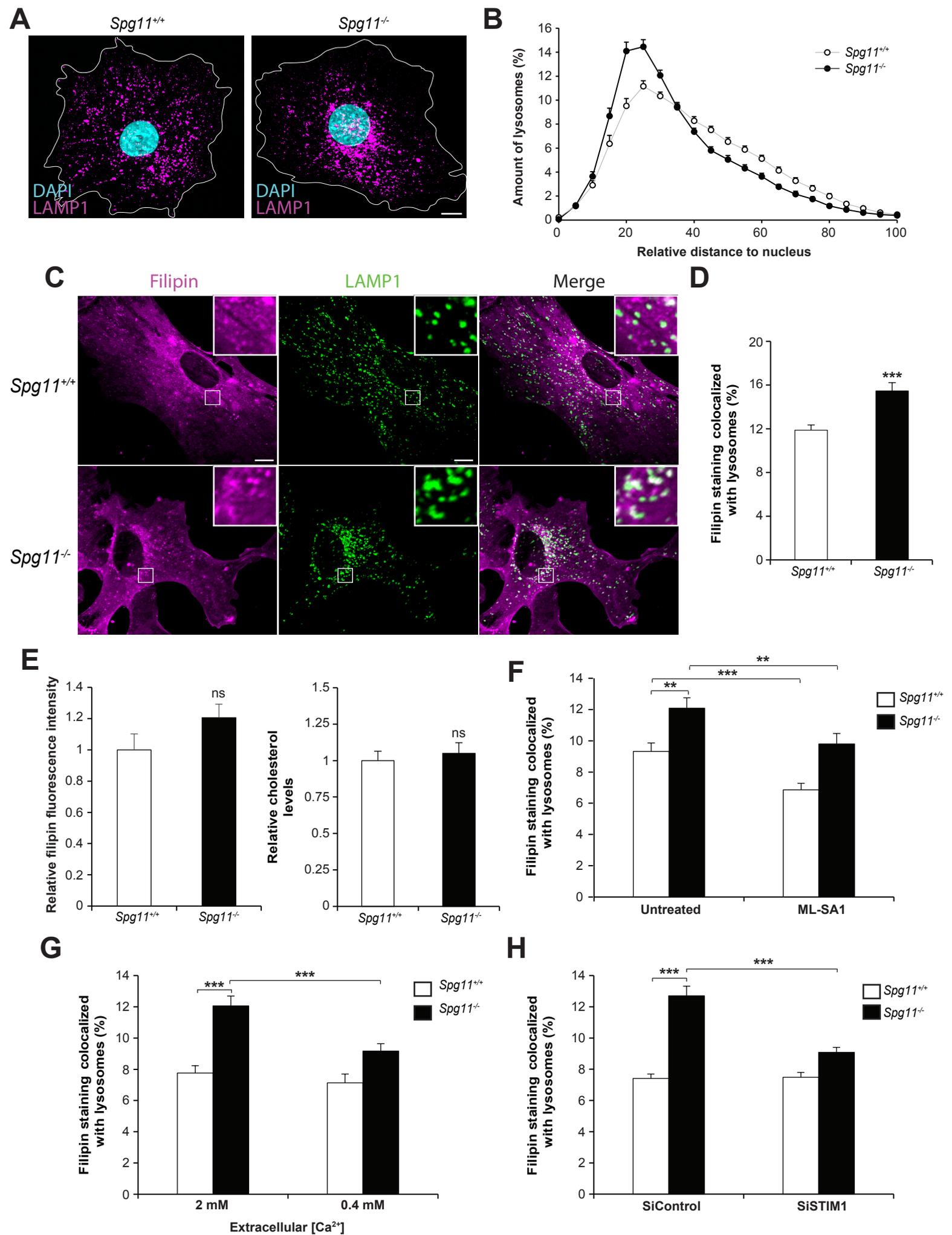


**D**

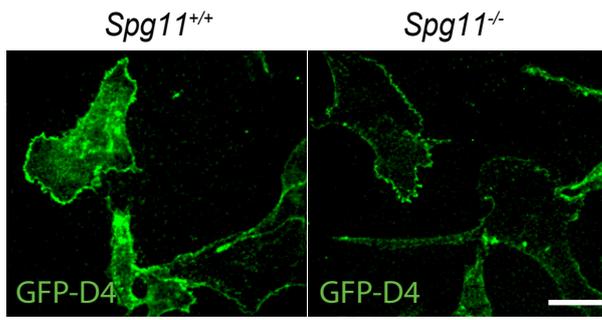


**E**

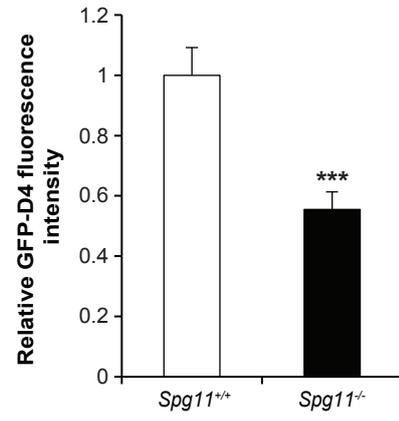




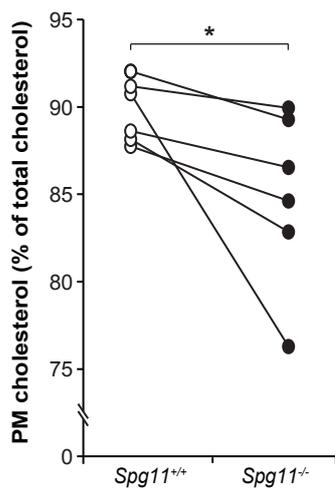
**A**



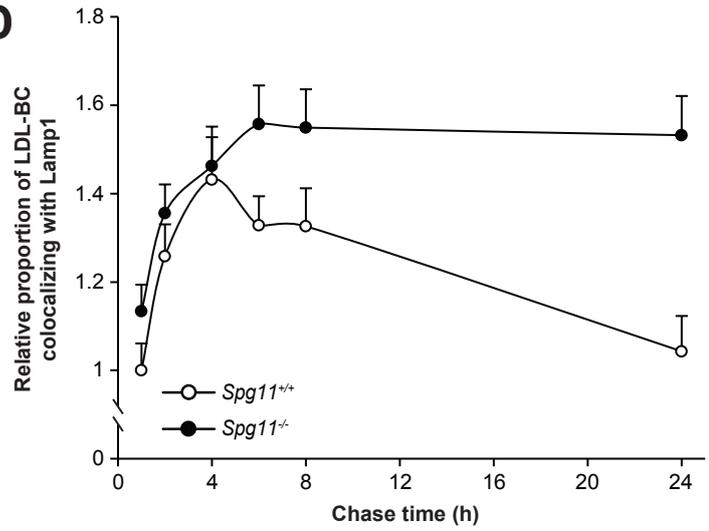
**B**

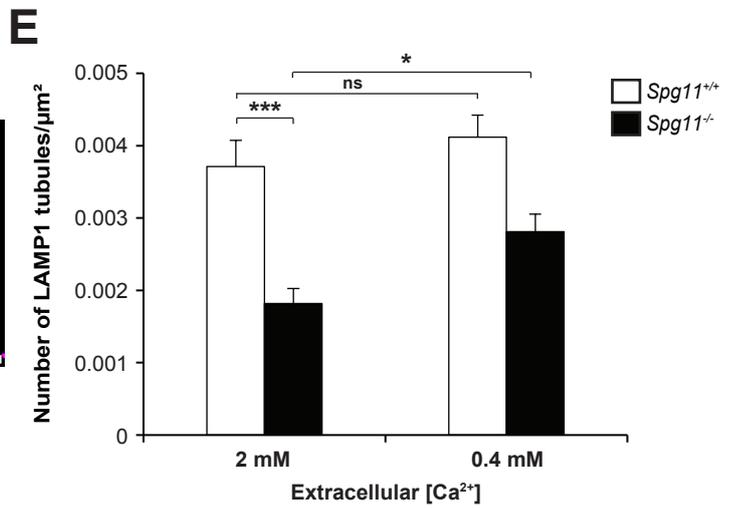
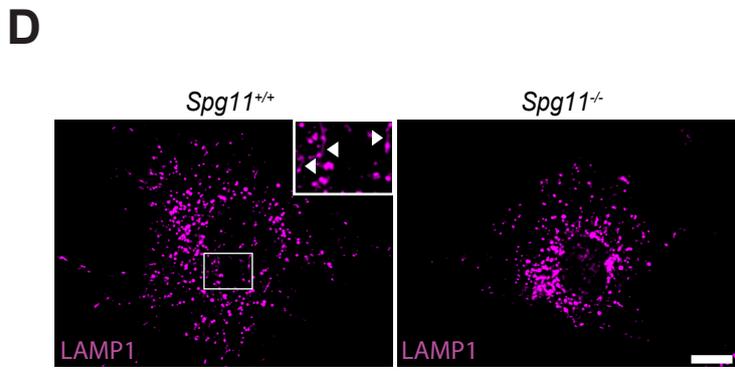
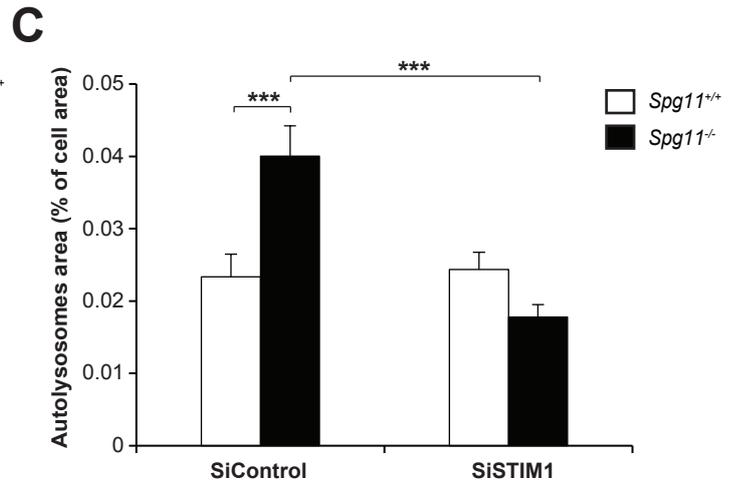
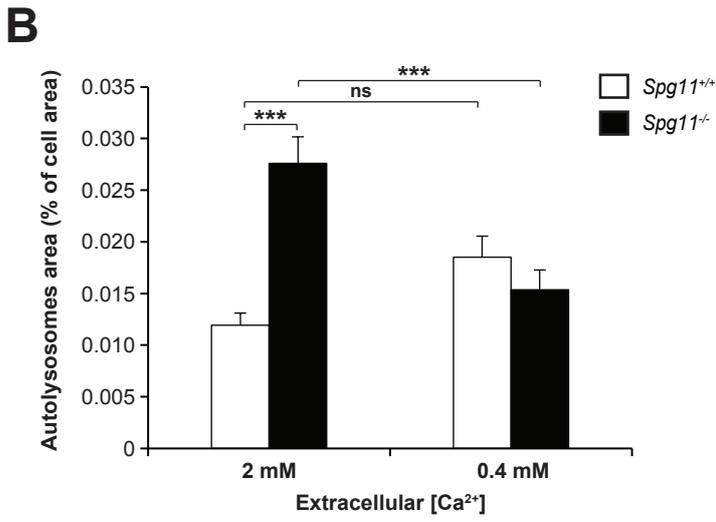
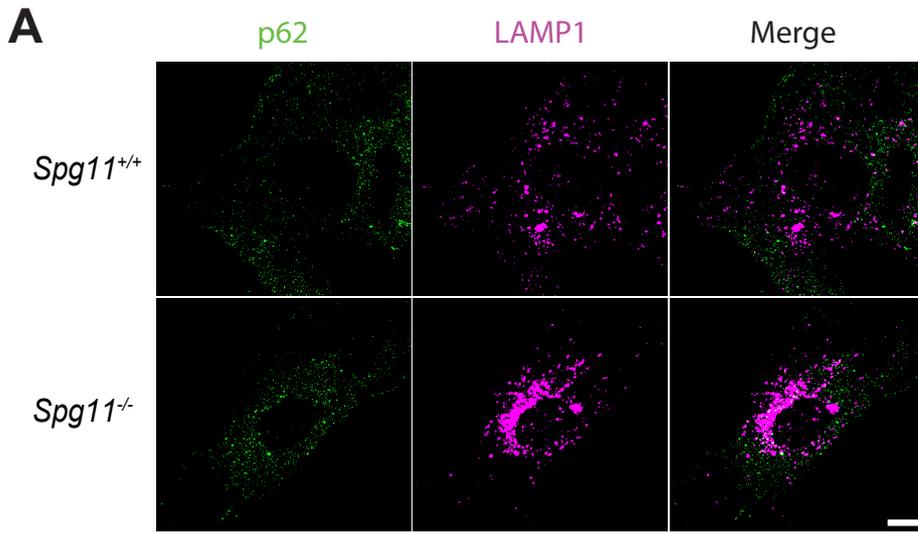


**C**



**D**





#### 4) Contribution :

J'ai réalisé l'ensemble des expériences présentées dans ce manuscrit à l'exception de la microscopie électronique réalisée sur les cerveaux des souris âgées de deux mois, qui a été réalisée par Khalid Hamid El Hachimi et Frédéric Darios. J'ai pu bénéficier des conseils et de l'expertise d'Elise Balse (UPMC) pour l'utilisation de la microscopie TIRF. J'ai également encadré, dans le cadre de ce projet, un étudiant en première année de Master qui a réalisé une partie des expériences sur l'accumulation de cholestérol dans les lysosomes.

Pour cette étude, j'ai réalisé la conception des expériences et l'écriture du manuscrit avec Frédéric Darios et j'ai préparé les différentes figures présentées dans l'article.

#### 5) Discussion :

La perte de fonction de la spatacsine est responsable de l'accumulation de lipides dans les lysosomes (Branchu et al., 2017) et de la perturbation du recyclage de la membrane de ces organites (Chang et al., 2014; Varga et al., 2015). Au cours de cette étude j'ai démontré qu'une dérégulation de l'homéostasie calcique contribue à ces perturbations du fonctionnement des lysosomes. En effet, l'absence de spatacsine cause une augmentation de l'import de calcium extracellulaire par le mécanisme du « Store Operated Calcium Entry » (SOCE). Le SOCE est un processus qui permet l'import de calcium depuis le milieu extracellulaire pour refournir les stocks de calcium dans la cellule et en particulier celui du réticulum endoplasmique (Smyth et al., 2010). Ce phénomène participe aussi à des voies de signalisation (Jara et al., 2014; Majewski and Kuznicki, 2015; Maus et al., 2017). L'augmentation de l'import de calcium par le SOCE, dans les cellules *Spg11<sup>-/-</sup>* pourrait provenir d'une mauvaise inhibition du processus. En effet, la dissociation des complexes de protéines STIM1 après entrée de calcium dans le cytosol est altérée. Plusieurs protéines sont connues pour jouer un rôle dans l'inhibition du SOCE pour éviter une entrée trop importante de calcium dans la cellule (Hogan and Rao, 2015; Palty et al., 2012). Il serait intéressant de vérifier les niveaux d'expression de ces protéines ou de déterminer si la spatacsine joue un rôle dans ce processus. Ce défaut d'inhibition pourrait aussi provenir d'une altération des contacts entre le réticulum endoplasmique et la membrane plasmique qui sont augmentés en taille et en nombre dans les neurones de cortex de souris *Spg11<sup>-/-</sup>*. Le SOCE a lieu au niveau de ces zones de contacts (Saheki and De Camilli, 2017).

Cette mauvaise régulation de l'import de calcium est responsable d'une légère augmentation de la concentration en calcium dans le cytosol. Cette augmentation pourrait, avec le temps, participer à la neurodégénérescence dans la PSH de type SPG11 : des dérégulations de l'homéostasie calcique

étant impliquées dans de nombreuses pathologies neurodégénératives (Mattson, 2007). Puisque le système lysosomal est perturbé par la perte de fonction de la spatacsine et que les niveaux de calcium dans les lysosomes sont changés dans plusieurs maladies de surcharge des lysosomes (MSL) (Lloyd-Evans and Platt, 2011), j'ai évalué les niveaux de calcium des lysosomes. Les lysosomes des cellules mutantes contiennent plus de calcium. Cela pourrait être la conséquence d'un effet tampon de ces lysosomes qui capteraient du calcium du cytosol pour diminuer la concentration cytosolique. L'efflux de calcium par le TRPML1 est réduit en absence de spatacsine ce qui pourrait là aussi contribuer à une augmentation des niveaux de calcium dans les lysosomes. Il est intéressant de noter que des pertes de fonctions de TRPML1 sont à l'origine d'une MSL (Sun et al., 2000) ce qui suggère que les accumulations de lipides observées dans les cellules *Spg11*<sup>-/-</sup> pourraient résulter en partie d'une diminution de l'efflux de calcium des lysosomes.

Nous avons précédemment montré que des lipides s'accumulent dans les lysosomes des cellules *Spg11*<sup>-/-</sup> (Branchu et al., 2017). J'ai cherché à identifier certaines des espèces lipidiques qui s'accumulent. L'analyse de la position des lysosomes dans les cellules a montré que les lysosomes sont plus proches du noyau dans les cellules mutantes par rapport aux cellules sauvages. Un tel phénotype a été décrit dans le cas d'accumulation de cholestérol dans les lysosomes (Rocha et al., 2009). La répartition du cholestérol dans les cellules mutantes est en effet altérée. Les lysosomes contiennent plus de cholestérol tandis que les niveaux à la membrane plasmique sont réduits. Ceci résulte d'une perturbation du trafic du cholestérol des lysosomes jusqu'aux autres organites. Le gène SPG11 avait par ailleurs été identifié comme impliqué dans le trafic du cholestérol des lysosomes jusqu'à la membrane plasmique par un criblage par ARN interférence (Chu et al., 2015). Nos précédents résultats suggèrent que l'accumulation de lipides dans les lysosomes des cellules *Spg11*<sup>-/-</sup> provient d'une diminution de l'export des lipides des lysosomes (Branchu et al., 2017). Il serait intéressant de voir si ces problèmes d'efflux sont spécifiques au cholestérol ou concernent plusieurs classes de lipides. L'accumulation de gangliosides dans les lysosomes des neurones en absence de spatacsine pourrait résulter du même phénomène, ou en être une conséquence secondaire. Il serait important de vérifier si les accumulations de gangliosides sont aussi présentes dans les fibroblastes ou si elles sont spécifiques aux neurones. L'implication de l'augmentation du SOCE dans les accumulations de gangliosides devra aussi être évaluée.

La réduction de l'import de calcium par le SOCE ou la stimulation de l'efflux de calcium des lysosomes permet de diminuer les accumulations de cholestérol dans les lysosomes suggérant que les problèmes dans la fonction des lysosomes en absence de spatacsine sont causés par la dérégulation de l'homéostasie calcique. Ceci suggère que la spatacsine pourrait réguler

l'homéostasie calcique par un mécanisme encore inconnu. Un rôle direct de la spatacsine au niveau des lysosomes ne peut toutefois pas être exclu. De manière intéressante la perturbation du recyclage des lysosomes dans les cellules mutantes peut être elle aussi corrigée par la diminution de l'import de calcium par le SOCE. Les corrections sont toutefois partielles suggérant qu'elles ne sont pas exclusivement la conséquence d'un problème calcique.

## **6) Conclusion :**

Dans cette étude j'ai pu démontrer que la perte de fonction de la spatacsine perturbe la régulation de l'entrée de calcium extracellulaire par le SOCE et que les niveaux de calcium dans le cytosol et les lysosomes sont augmentés. Ces altérations contribuent aux dysfonctions lysosomales observées en absence de spatacsine dont notamment l'accumulation de lipides et en particulier du cholestérol, mais aussi au recyclage des lysosomes.



## **IV) Liens entre les accumulations de gangliosides et de cholestérol :**

Au cours des deux études précédentes j'ai étudié les accumulations de lipides dans les lysosomes qui sont causées par la perte de fonction de la spatacsine. Dans les neurones, cette perte de fonction induit une accumulation de gangliosides simples dans les lysosomes ce qui perturbe leur recyclage (article 2). Dans les fibroblastes j'ai montré que les lysosomes accumulent du cholestérol et que ces accumulations proviennent, au moins en partie, d'une perturbation de l'homéostasie calcique (article 3). Ces deux études ont été menées en parallèle à la suite de l'analyse du modèle murin de la PSH de type SPG11 généré au laboratoire. Pourtant si ces deux études ont permis la mise en évidence d'altérations du métabolisme de deux espèces lipidiques différentes dans deux types cellulaires différents, plusieurs éléments pourraient indiquer que ces perturbations sont liées.

### **1) Co-accumulations du ganglioside GM2 et du cholestérol:**

Des accumulations conjointes de cholestérol et de gangliosides, et en particulier GM2, ont été rapportées dans plusieurs maladies de surcharge des lysosomes. C'est notamment le cas dans les mucopolysaccharidoses de types I, II, IIIa et VI (McGlynn et al., 2004; Micsenyi et al., 2009; Walkley and Vanier, 2009a; Walkley et al., 2005), l' $\alpha$ -mannosidose (Damme et al., 2011) ou encore dans la maladie de Niemann-Pick de type C (Sleat et al., 2004; Zervas et al., 2001). Il est souvent difficile de déterminer le lien existant entre ces accumulations et les cascades d'évènements responsables. Il semble que ces deux espèces lipidiques constituent des accumulations secondaires dans certaines pathologies (mucopolysaccharidoses notamment). L'étude des MSL dans lesquelles le GM2 ou le cholestérol s'accumule de façon primaire a permis de comprendre un peu mieux les mécanismes physiopathologiques mis en jeu.

#### **(a) Accumulations primaires du ganglioside GM2 :**

Des accumulations primaires de gangliosides pourraient être à l'origine d'accumulation secondaire de cholestérol. En effet, une forte augmentation des niveaux de cholestérol a été reportée dans des lymphocytes B de rate d'un modèle murin de la maladie de Sandhoff (de Vruyte et al., 2010). De plus, le croisement d'un modèle de souris de la maladie de Niemann-Pick de type C avec un modèle de souris mutante pour le gène *GalNAcT* (code pour une protéine impliquée dans la synthèse des gangliosides) diminue les accumulations de cholestérol dans le cerveau des souris (Liu et al., 2000). Toutefois, d'autres études n'ont montrées aucune augmentation des niveaux de cholestérol dans des modèles de Gangliosidoses à GM2 (dont fait partie la maladie de Sandhoff) (Arthur et al., 2013; Baek et al., 2009; Puri et al., 1999).

### (b) Accumulations primaires de Cholestérol :

La maladie de Niemann-Pick de type C est caractérisée par une forte accumulation de cholestérol et d'autres espèces lipidiques dont les gangliosides et en particulier le GM2 (Figure 38). L'impact physiopathologique de telles accumulations n'est pas encore établi. Comme déjà présenté dans l'introduction, des expériences réalisées à l'aide de souris mutantes pour les gènes *Npc1* et ceux codant pour les GM2 ou GM3 synthases voient leurs niveaux d'accumulations de gangliosides diminuer fortement sans améliorer l'espérance de vie des animaux (Liu et al., 2008, 2000). Les souris *Npc1<sup>-/-</sup>/GalNAcT<sup>-/-</sup>* (GalNAcT est le gène impliqué notamment dans la synthèse du GM2) ont une réduction des accumulations de cholestérol dans le cerveau mais la neurodégénérescence est toujours présente (Liu et al., 2000). Ces résultats suggèrent que les accumulations de gangliosides pourraient aggraver les accumulations de cholestérol dans les neurones dans la maladie de Niemann-Pick de type C. Il a été proposé que les protéines NPC1 et NPC2 (dont la perte de fonction est responsable de la pathologie) soient impliquées dans le trafic des gangliosides (Zervas et al., 2001). De nombreuses études ont permis d'élucider la fonction de ces deux protéines. Elles participent au transfert du cholestérol depuis les lysosomes et endosomes tardifs vers la membrane d'autres organites dont celle du réticulum endoplasmique ou encore des peroxysomes (Chu et al., 2015; Infante et al., 2008). Il apparaît alors que l'accumulation lipidique primaire est celle du cholestérol et donc que les accumulations de gangliosides résulteraient d'altérations dans le trafic du cholestérol.

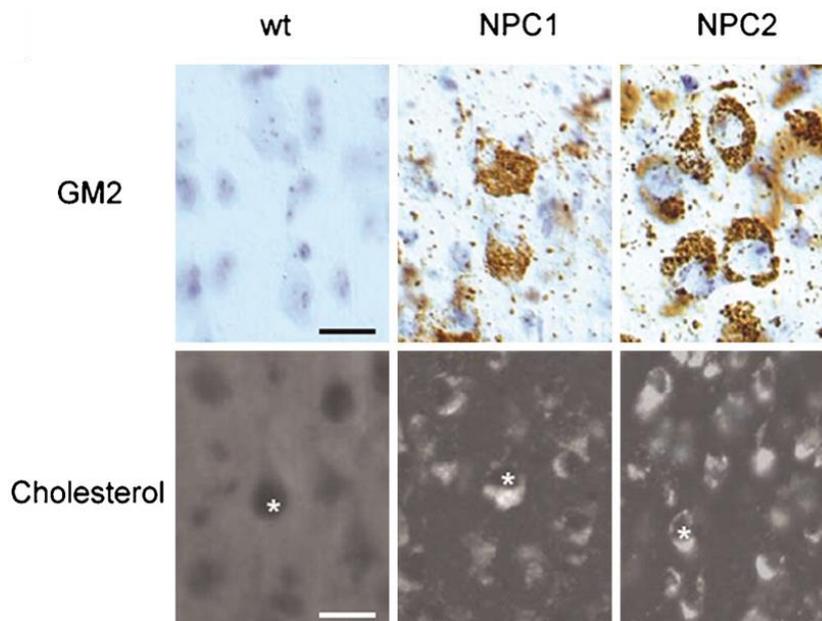


Figure 38: Accumulations de cholestérol et de ganglioside GM2 dans les neurones d'un modèle murin de la pathologie de Niemann-Pick de type C, invalidé pour le gène *Npc1* et âgé de 7 semaines (Sleat et al., 2004).

Récemment, deux études ont montré que des niveaux trop élevés de cholestérol auraient un effet inhibiteur sur le catabolisme du GM2. En effet, une équipe a reconstitué un modèle *in vitro* de la dégradation du GM2 en utilisant des liposomes et les protéines nécessaires à ce processus : la protéine adaptatrice du GM2 (GM2 adaptator protein) et la  $\beta$ -hexosaminidase A (Figure 39). L'incorporation de niveaux de cholestérol plus élevés que ceux observés dans des lysosomes normaux, induit une forte inhibition de la dégradation du GM2 (Anheuser et al., 2015). De plus, l'activité de la  $\beta$ -hexosaminidase A de neurones dérivés d'IPS produit à partir de fibroblastes de patients souffrant de la maladie de Niemann-Pick de type C est réduite par rapport à celle des cellules contrôles (Trilck et al., 2017). Une analyse *in silico* indique que l'affinité de la  $\beta$ -hexosaminidase A serait plus forte pour le cholestérol que pour le GM2 ce qui suggère que la diminution d'activité observée pourrait résulter d'une inhibition par compétition.

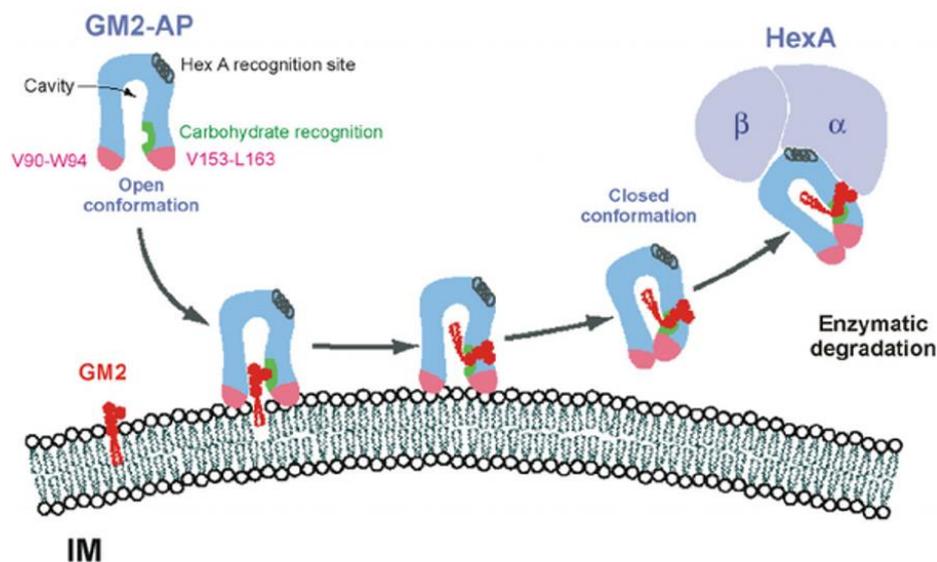


Figure 39: Représentation de la dégradation du GM2. La protéine adaptatrice du GM2 (GM2-AP) reconnaît le GM2 et le libère de la membrane pour l'amener à la  $\beta$ -hexosaminidase A (HexA) qui réalise la dégradation du GM2. Adapté de (Anheuser et al., 2015).

## 2) Liens expérimentaux entre les accumulations de GM2 et de cholestérol :

### (a) Accumulations du GM2 et du cholestérol, respectivement, dans les fibroblastes et les neurones *Spg11*<sup>-/-</sup> :

Les accumulations de gangliosides sont principalement retrouvées dans les neurones dans les MSL, probablement parce que l'expression des gangliosides est plus forte dans le système nerveux central (Sandhoff and Harzer, 2013). La réalisation d'immunomarquages du GM2 dans les fibroblastes embryonnaires murins montre que les agrégats de ganglioside GM2 semblent présents dans les fibroblastes mais de manière moins importante que dans les neurones. Toutefois l'accumulation de

gangliosides dans les lysosomes des fibroblastes est tout de même présente (Figure 40). Ces résultats préliminaires sont à confirmer mais suggèrent que les problèmes dans le catabolisme des gangliosides sont aussi présents dans ces cellules.

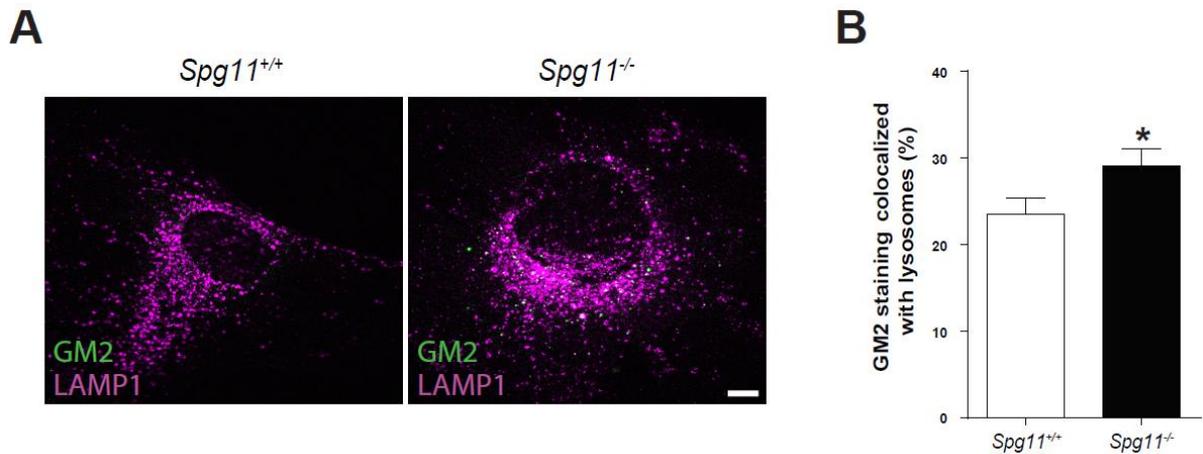


Figure 40 : Les accumulations du ganglioside GM2 sont aussi présentes dans les fibroblastes embryonnaires murins, mais de manière moins marquée que dans les neurones. (A) Les cellules ont été marquées avec des anticorps reconnaissant le GM2 (vert) et le marqueur des lysosomes Lamp1 (magenta). Barre d'échelle = 10µm. (B) Quantification du marquage GM2 colocalisant avec le marquage Lamp1 (en %). N>45 cellules analysées dans 3 expériences indépendantes. Barre-erreurs = erreur-type \* = p<0,05, T-test. Barres d'échelle = 10µm.

Nous avons aussi cherché à savoir si les neurones en cultures présentent aussi des accumulations de cholestérol dans les lysosomes. Un étudiant en deuxième année de master a, au cours de son projet, réalisé des marquages du cholestérol dans des neurones en culture en utilisant la protéine recombinante GFP-D4 qui lie spécifiquement le cholestérol (Maekawa et al., 2016). Ces marquages ont montré que les accumulations de cholestérol sont aussi présentes dans les lysosomes des neurones *Spg11<sup>-/-</sup>* (Figure 41).

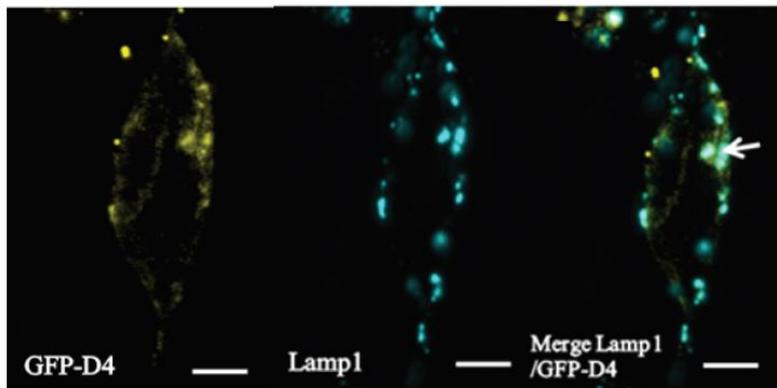
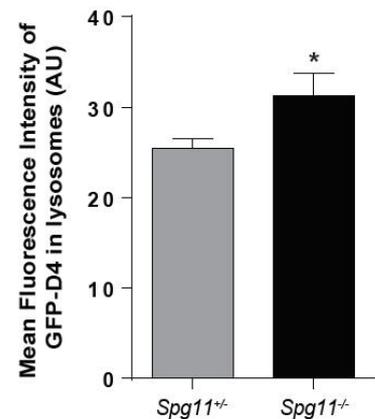
**A****B**

Figure 41 : Accumulations de cholestérol dans les neurones *Spg11<sup>-/-</sup>*. (A) Marquages du cholestérol par le GFP-D4 (jaune, incubation 20 minutes à température ambiante, 15µg/mL) et des lysosomes et endosomes tardifs par le marqueur lamp1 (cyan) dans un neurone *Spg11<sup>-/-</sup>*. La flèche blanche montre la présence de cholestérol dans des lysosomes. (B) Quantification de l'intensité du marquage GFP-D4 dans les lysosomes. Des cellules hétérozygotes ont été utilisées comme contrôles pour cette expérience Barres d'erreurs = erreur-type. \*=p<0,05 Mann-Whitney test. Expérience réalisée par Alexandre Pierga.

Ces résultats, qui sont à confirmer, semblent indiquer que les cellules (fibroblastes et neurones) en culture accumulent dans leurs lysosomes des gangliosides GM2 et du cholestérol. La PSH de type SPG11 ferait alors partie des pathologies où des accumulations de ces deux lipides sont retrouvées.

### (b) L'inhibition de l'efflux du cholestérol des lysosomes induit une accumulation massive de GM2 :

Pour mieux établir la cascade d'événements résultant de la perte de fonction de la spatascine et aboutissant aux dysfonctions des lysosomes (accumulations de lipides et problèmes de reformation des lysosomes), j'ai inhibé le trafic du cholestérol des lysosomes vers les autres organites en traitant des cellules sauvages avec le U18666a. Cette molécule induit un phénotype similaire à celui observé dans la maladie de Niemann-Pick de type C, en inhibant l'efflux du cholestérol provenant des LDL dans les lysosomes (Liscum and Faust, 1989). Récemment il a été démontré qu'une des cibles du U18666a est la protéine NPC1, ce qui explique l'effet de la molécule sur le trafic du cholestérol lysosomal (Lu et al., 2015). Le traitement des fibroblastes sauvages avec le U18666a induit, comme attendu, l'accumulation massive de cholestérol dans les lysosomes mais aussi de ganglioside GM2 dans ces mêmes lysosomes (Figure 42). Il faut toutefois noter que les accumulations de GM2 ne sont retrouvées qu'environ dans la moitié des cellules traitées, tandis que les accumulations de cholestérol sont présentes dans l'immense majorité des fibroblastes. Ces résultats suggèrent que l'inhibition de l'export du cholestérol des lysosomes, et son accumulation dans ces organites,

provoquent une accumulation importante de GM2 dans ces mêmes structures. Ceci est en accord avec un rôle inhibiteur du cholestérol dans le catabolisme du GM2 (Anheuser et al., 2015; Trilck et al., 2017).

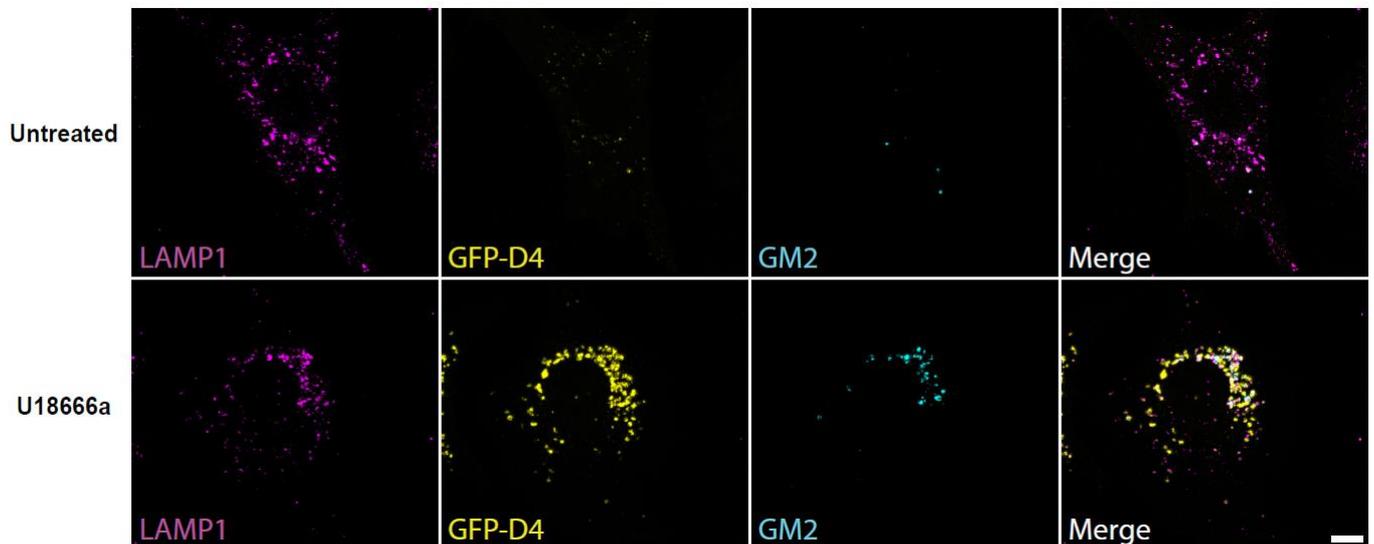
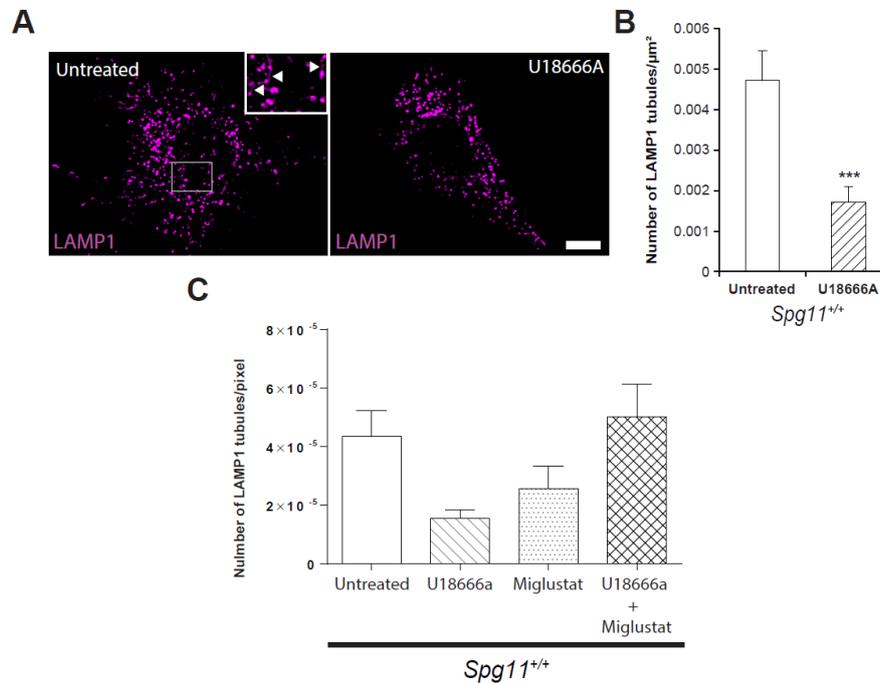


Figure 42 : Accumulation de GM2 dans les lysosomes induite par un traitement de l'U18666a (0,2µg/mL pendant 24 heures) qui bloque la sortie du cholestérol des lysosomes. Le traitement provoque une accumulation massive de cholestérol (GFP-D4) et de GM2 dans les lysosomes (Lamp1). Barre d'échelle = 10µm

De manière intéressante, en présence de nutriments (Figure 43A-B), le traitement au U18666A réduit considérablement la tubulation des lysosomes qui participe à l'ALR. Dans notre étude sur l'accumulation de gangliosides dans les lysosomes de neurones en absence de spatacine, nous avons montré que le recyclage des lysosomes est altéré par des augmentations de niveaux des gangliosides, et en particulier du GM2, dans les lysosomes. La reformation des lysosomes passe en partie par un processus de tubulation dans les fibroblastes (voir introduction). Dans le cas du traitement au U18666a il n'est pas clairement établi que le blocage de la reformation des lysosomes soit dû à l'augmentation des niveaux de cholestérol et/ou de GM2 dans les lysosomes. Pour déterminer si l'augmentation de cholestérol pourrait à elle seule empêcher le bon recyclage des lysosomes j'ai quantifié la tubulation des lysosomes dans des cellules traitées au u18666a et au miglustat, qui inhibe la synthèse du glucosylcéramide, et donc inhibe l'accumulation des gangliosides dans les lysosomes (Patterson et al., 2010). Ce double traitement induit une tubulation similaire à celle des cellules non traitées, suggérant que l'inhibition de l'accumulation de gangliosides rétablit la reformation des lysosomes dans les cellules où le trafic du cholestérol des lysosomes est inhibé (Figure 43C). Toutefois plusieurs points restent à éclaircir : un traitement au miglustat diminue la tubulation et change la morphologie des lysosomes (données non présentées) suggérant

que la synthèse des gangliosides (ou du glucosylcéramide) est importante pour la fonction des lysosomes dans les fibroblastes. De plus, il est nécessaire de vérifier si les cellules doublement traitées présentent des accumulations de cholestérol similaires aux cellules traitées par le U18666a. Ces résultats sont, là aussi, à reproduire.



**Figure 43: Effet de l'accumulation de cholestérol et de gangliosides induite par le U18666a sur la tubulation des lysosomes. (A-B) Le traitement au U18666a diminue fortement la tubulation dans des cellules sauvages. Barre d'échelle = 10μm. Barre. n>50 cellules (C) Quantification du nombre de tubules dans des cellules sauvages traitées par le U18666a et/ou le miglustat. n<10 cellules. Barre d'erreur = erreur-type. \*\*\*=p<0,001.**

### (c) Effet de la modulation de l'homéostasie calcique sur l'accumulation des gangliosides :

Comme la modulation de l'homéostasie calcique réduit les altérations du cholestérol lysosomal dans les cellules *Spg11<sup>-/-</sup>* j'ai diminué l'import de calcium extracellulaire par le SOCE et j'ai mesuré les accumulations de GM2 dans les fibroblastes embryonnaires murins. L'inhibition du SOCE réduit les niveaux de GM2 dans les lysosomes de ces cellules (Figure 44A). La libération de calcium lysosomal par le canal calcique lysosomal TRPML1, sous l'effet du ML-SA1, corrige aussi partiellement les accumulations de GM2 dans les lysosomes des neurones *Spg11<sup>-/-</sup>* (Figure 44B). Ces données semblent indiquer que les accumulations de gangliosides dans les lysosomes sont au moins en partie causées, comme celles de cholestérol, par une altération de l'homéostasie calcique dans les cellules.

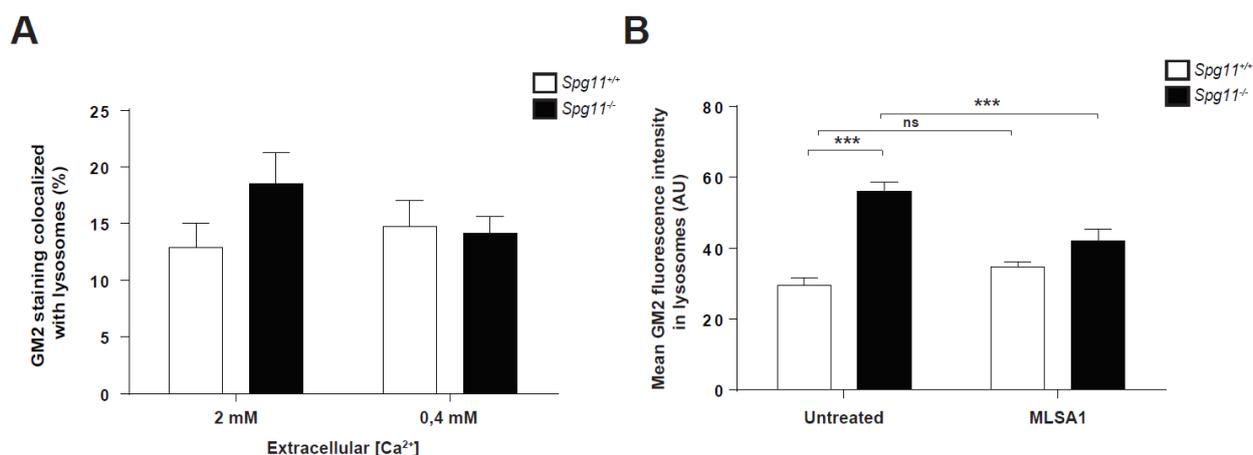


Figure 44 : Effet de la modulation de l'homéostasie calcique sur les accumulations de GM2 dans les lysosomes. (A) Mesure de la proportion de marquage GM2 colocalisant avec les lysosomes dans des fibroblastes en présence de concentrations normales ou réduites de calcium extracellulaire, permettant d'inhiber l'import de calcium par le SOCE. n<10 cellules. (B) Mesure de la proportion de marquage GM2 colocalisant avec les lysosomes dans des neurones dans des conditions basales (untreated) ou traitées avec le ML-SA1. n<40 cellules. \*\*\*=p<0,001.

### 3) Conclusion et perspectives :

Ainsi, ces résultats qui sont en grande partie à confirmer, suggèrent que les accumulations de cholestérol et de ganglioside GM2 sont présentes dans les deux types cellulaires différents, que j'ai utilisé au cours de ma thèse : les fibroblastes et les neurones embryonnaires murins. L'inhibition pharmacologique de l'export du cholestérol lysosomal induit une accumulation massive de GM2 dans les lysosomes de cellules sauvages, ce qui suggère que les accumulations de GM2 que nous avons mises en évidence pourraient provenir d'une altération du trafic du cholestérol des lysosomes vers les autres organites. Plusieurs données de la littérature montrent par ailleurs que des niveaux trop élevés de cholestérol dans les lysosomes inhibent la dégradation du GM2 (Anheuser et al., 2015; Trilck et al., 2017) ce qui est cohérent avec nos résultats. Les accumulations de cholestérol et de GM2 induites par le traitement au U18666a réduisent fortement la tubulation et donc le recyclage des lysosomes. Le rôle précis des augmentations de cholestérol sur le recyclage n'est pas clair et est rendue difficile par l'effet du miglustat qui diminue la tubulation des lysosomes. Il faut, en outre, évaluer l'effet du miglustat sur les accumulations de cholestérol dans les lysosomes. Des expériences complémentaires sont à effectuer pour comprendre tous les mécanismes physiopathologiques mis en jeu. En effet, il est nécessaire d'étudier si les altérations de l'import de calcium par le SOCE sont présentes dans les neurones *Spg11<sup>-/-</sup>*, ainsi que les augmentations des niveaux de calcium dans le cytosol et les lysosomes. La libération de calcium lysosomal par le canal calcique TRPML1 doit aussi être mesurée. Le fait que l'inhibition de l'import de calcium par le

SOCE et que l'activation du canal TRPML1 permettent de réduire les accumulations de gangliosides dans les cellules, suggère qu'une perturbation de l'homéostasie calcique pourrait être à l'origine de l'ensemble des dysfonctions lysosomales causées par la perte de fonction de la spatacsine. Enfin, le rôle moléculaire de la spatacsine reste à élucider pour comprendre les défauts primaires de la PSH de type SPG11.



## Discussion :

Ce travail de thèse a eu pour but l'étude des dysfonctions des lysosomes et leurs implications dans la neurodégénérescence. Je me suis, en particulier, intéressé aux défauts de recyclage de ces organites et aux accumulations de lipides en leur sein.

Pour mener à bien ces études j'ai utilisé des modèles cellulaires (provenant d'un modèle murin) de la PSH de type SPG11. Cette pathologie d'origine génétique est caractérisée par un processus neurodégénératif sévère qui induit des troubles moteurs et cognitifs chez les patients dont le gène responsable a été identifié dans le laboratoire d'accueil (Stevanin et al., 2007). Les mutations causant la pathologie sont en grande partie des mutations aboutissant à l'apparition d'un codon stop prématuré dans l'ARN messager issu des deux allèles ce qui suggère que la maladie est causée par la perte de fonction de la protéine codée par le gène *SPG11* (Kara et al., 2016). Il faut noter que des mutations du gène *SPG11* sont aussi en cause dans des formes rares de sclérose latérale amyotrophique (SLA) et de maladie de Charcot-Marie Tooth (Daoud et al., 2012; Montecchiani et al., 2016). Plusieurs études publiées sur les conséquences de la perte de fonction de la spatacsine impliquent des dysfonctions lysosomales et plus précisément une altération de la reformation des lysosomes dans la pathologie (Chang et al., 2014; Renvoisé et al., 2014; Varga et al., 2015). Ainsi, l'étude des mécanismes physiopathologiques impliqués dans la PSH de type SPG11 représente une opportunité de mieux comprendre les liens entre les dysfonctions des lysosomes et les maladies neurodégénératives. Comme des altérations dans la fonction des lysosomes participent ou sont à l'origine de nombreuses maladies du système nerveux central une meilleure compréhension des mécanismes en jeu, de leurs causes et conséquences est cruciale pour le développement de pistes thérapeutiques, si possibles communes.

Au début de mon projet de thèse, nous savions que la perte de fonction de la spatacsine induisait une augmentation de la taille des lysosomes (Renvoisé et al., 2014) ainsi que des défauts de recyclage de la membrane de ces organites (Chang et al., 2014). Pour élucider les mécanismes physiopathologiques en cause ainsi que leurs conséquences, l'équipe d'accueil a généré un modèle murin dans lequel le gène *SpG11* est muté ce qui induit l'absence de la protéine.

## I) Le modèle murin *Spg11*<sup>-/-</sup> :

### 1) Pertinence du modèle :

Nous avons caractérisé ce modèle aussi bien au niveau comportemental que cellulaire. L'utilisation de la souris comme modèle est justifiée par le fait que le gène *Spg11* a une grande homologie avec le gène humain (>75% de similarité entre les séquences en acides aminés) et que la spatacine est une protéine qui est très conservée (Stevanin et al., 2007). La partie comportementale et l'analyse histologique ont été réalisées par Julien Branchu, post-doctorant dans l'équipe. Cette partie ne sera que peu abordée au cours de cette discussion.

Toutefois, il est important de noter que les souris *Spg11*<sup>-/-</sup> présentent des troubles moteurs et cognitifs qui rappellent ceux observés chez les patients. Les troubles moteurs commencent dès l'âge 6 semaines ce qui est cohérent avec la pathologie humaine où les premiers symptômes apparaissent généralement lors de la première ou la seconde décennie de la vie (Stevanin et al., 2008). Des troubles cognitifs apparaissent progressivement entre 2 et 4 mois. Une perte neuronale est aussi présente dans plusieurs zones du système nerveux central dont notamment le cortex moteur ou encore l'hippocampe, en accord avec les signes cliniques majeurs observés. Une perte de force musculaire, une atrophie musculaire ainsi qu'une fragmentation de la jonction neuromusculaire ont été observées chez ces souris ce qui est cohérent avec l'implication de mutations de SPG11 dans des formes rares de SLA (Orlacchio et al., 2010). Toutefois, l'atrophie musculaire ne semble pas être la conséquence d'une dénervation des muscles suggérant que la spatacine pourrait jouer un rôle au niveau des muscles et que sa perte de fonction est responsable d'une atrophie de ces tissus. Les troubles s'aggravent avec le temps ce qui, là aussi, est cohérent avec l'aggravation des troubles observée chez les patients (Stevanin et al., 2006, 2008). Ainsi, ce modèle est pertinent pour l'étude de la pathologie humaine puisque qu'il récapitule une grande partie des signes cliniques de la pathologie humaine.

### 2) Comparaison avec le modèle d'une équipe concurrente :

Durant la caractérisation de notre modèle une autre équipe a publié la première étude sur un modèle murin de la pathologie (Varga et al., 2015). Si les deux modèles montrent de grandes similitudes, comme les troubles moteurs ou encore l'accumulation de matériels dans les autolysosomes, il est important de noter qu'il existe plusieurs différences importantes. En effet, l'ensemble des troubles moteurs mis en évidence par l'équipe concurrente débute seulement à un âge avancé des souris (12 et 13 mois) tandis que nous avons détecté les premières altérations motrices dès 4 mois d'âge. Nos résultats sont ainsi en accord avec le début généralement précoce de la maladie chez l'Homme.

L'amincissement du corps calleux, une des caractéristiques de la pathologie humaine présente dans notre modèle, tout comme l'atteinte des motoneurones périphériques n'ont pas été rapportés dans l'étude publiée par Varga et al. Les différences entre ces deux modèles pourraient provenir de la stratégie d'inactivation du gène *Spg11*. Nous avons invalidé le gène en insérant deux codons stop consécutifs dans l'exon 32 (Figure 45B) tandis que Varga et al (2015) ont utilisé la technique du « Gene-trap » qui consiste en l'insertion d'une cassette (Figure 45A) qui est formée d'un gène rapporteur et d'une séquence de terminaison de la transcription (site de polyadénylation), ce qui aboutit dans ce cas à la traduction d'une protéine rapportrice couplée à un fragment N-terminal de 82 acides aminés de la protéine (celui codé par le premier exon). Les deux techniques d'inactivation pourraient avoir des effets différents sur des potentielles isoformes de la spatacine. Les deux techniques aboutissent à l'absence de la protéine complète (Branchu et al., 2017; Varga et al., 2015).. Le gène *SPG11* (et son homologue murin) est constitué de 40 exons, il est donc possible que des isoformes résultant d'un épissage alternatif puissent exister. Nous n'avons pas été en mesure de vérifier l'expression de potentielles isoformes ou formes tronquées de la spatacine puisque nous ne disposons que d'un anticorps reconnaissant la partie C-terminale de la protéine. Il est aussi possible que des facteurs environnementaux, génétiques ou encore épigénétiques qui diffèrent entre les deux modèles soient à l'origine des différences phénotypiques entre les deux modèles. Enfin, la pathologie humaine est marquée par une importante variabilité clinique entre les patients, parfois pour des mutations identiques dans une même famille (Daoud et al., 2012) et les différences entre les deux modèles pourraient témoigner de cette variabilité. Un point commun important découle de l'analyse histologique et cellulaire des deux modèles, qui met en évidence des accumulations de matériels dans les lysosomes et une augmentation du nombre d'autolysosomes (Branchu et al., 2017; Varga et al., 2015) qui semble provenir d'une altération de la reformation des lysosomes après le processus autophagique (Chang et al., 2014). Il est important de noter que Varga et al., ont observé une diminution du nombre de lysosomes, et ont conclu qu'elle proviendrait des problèmes de recyclage des lysosomes. Cette étude suggère que la diminution du nombre de lysosomes favoriserait l'accumulation de matériels non digérés dans les cellules et participerait donc à la pathologie. Nous n'avons pas observé de diminution du nombre de lysosomes dans notre modèle. Il pourrait alors exister un phénomène compensatoire qui ferait intervenir une biogénèse de lysosomes pour maintenir des quantités normales de lysosomes. Toutefois, nous avons montré que les matériels qui s'accumulent dans ces structures sont, au moins partiellement, de nature lipidique.

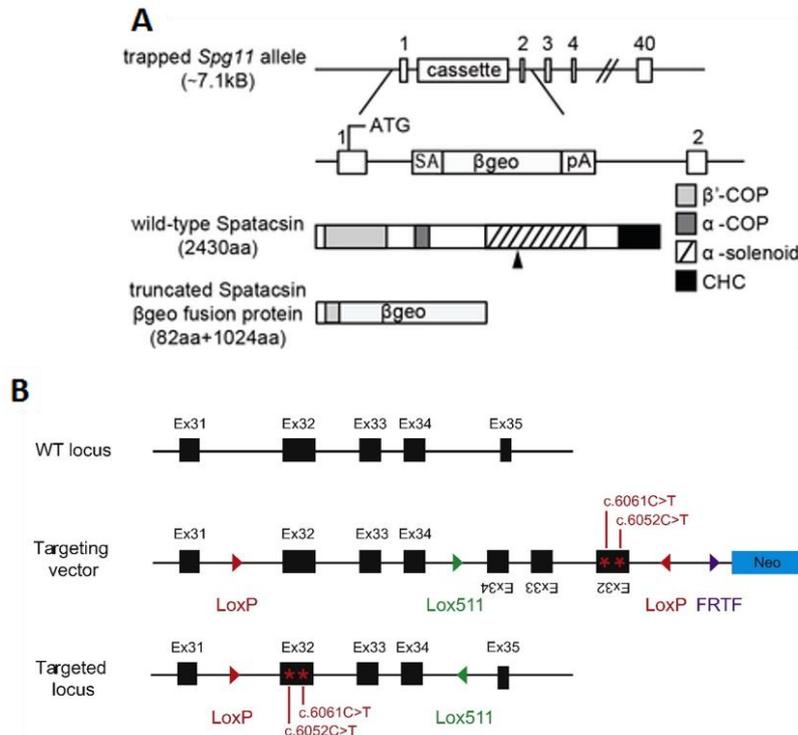


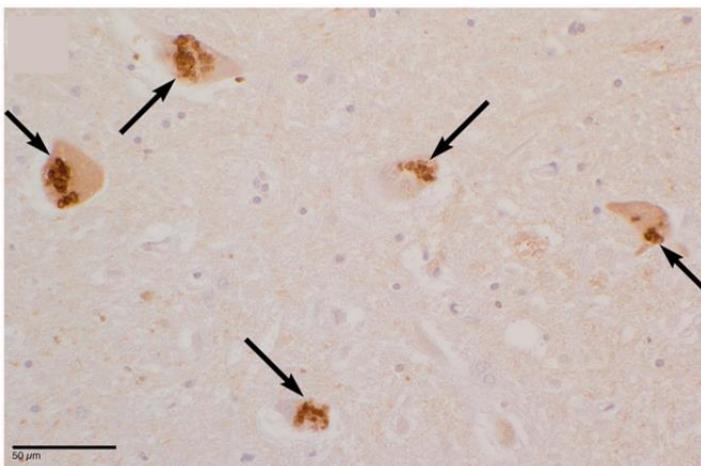
Figure 45: Comparaison des techniques d'inactivation du gène *Spg11* utilisées dans deux modèles murins. (A) Utilisation du « Gene-trapping » par insertion d'un gène rapporteur ( $\beta$ geo :  $\beta$ -galactosidase) dans le premier intron du gène *Spg11*. La forme complète de la protéine ainsi que des domaines fonctionnels putatifs qui la composent (CHC : Chaîne lourde de la clathrine) et de la protéine tronquée qui résulte de l'inactivation sont représentées. SA : Site accepteur d'épissage ; PA : Site de polyadénylation. (Varga et al., 2015). (B) Insertion de deux codons stop successifs dans l'exon 32 du gène *Spg11*. Cet exon est fréquemment muté dans la pathologie humaine. (Branchu et al., 2017).

### 3) Dysfonctions des lysosomes et accumulation de lipides observées dans le modèle *Spg11*<sup>-/-</sup> :

Par l'utilisation de techniques de microscopies à fluorescence et électronique en transmission nous avons mis en lumière des accumulations autofluorescentes qui sont entourées par le marqueur Lamp1. En microscopie électronique, les lysosomes contenant des accumulations osmiophiles sont plus nombreux dans les cellules *Spg11*<sup>-/-</sup> et ces accumulations sont constituées de lipides. Elles sont détectables à des stades précoces de la pathologie, avant même que la perte neuronale soit présente. Ces accumulations ont été retrouvées dans des cellules embryonnaires (neurones et fibroblastes en culture). De plus, les organoïdes issus de cellules prélevées sur des patients SPG11, qui sont des structures embryonnaires, accumulent aussi des gangliosides. La perte de fonction de la spatacine pourrait donc avoir une conséquence neurodéveloppementale, une hypothèse qui peut être émise en accord avec l'apparition précoce des premiers signes cliniques et notamment la description d'un retard mental chez certains patients. De manière cohérente, une étude utilisant des cellules souches à pluripotence induites, dérivées en progéniteurs neuronaux a montré que la perte de fonction de

la spatacsine est responsable d'altérations transcriptionnelles lors du développement (Mishra et al., 2016).

Les agrégats autofluorescents sont entourés par le marquage Lamp1 (endosomes tardifs et lysosomes), et le nombre et la taille de ces structures augmentent avec le temps. Par contre ces structures ne sont marquées par des marqueurs d'autophagie (p62 ou LC3-II) qu'à des stades avancés de la pathologie. Des problèmes dans le processus autophagique (outre le recyclage des lysosomes) pourraient exister comme le suggère ces résultats ainsi que la présence d'agrégats marqués par des anticorps anti-p62 dans les cerveaux de patients de la PSH de type SPG11 (Figure 46) (Denora et al., 2016). A l'inverse, ces stigmates pourraient être le reflet d'un processus autophagique altéré par une dysfonction primaire des lysosomes au cours du temps. Toutefois, les expériences réalisées à la suite de cette étude montrent que les lipides s'accumulent principalement dans des autolysosomes (lysosomes marqués par la protéine p62) perturbant leur recyclage (Article 2). L'accumulation de lipides dans les cellules peut être forcée en incubant les cellules dans un milieu ne contenant pas de nutriments. Si la privation de nutriments est soutenue dans le temps, les lipides sont alors exportés vers d'autres organites et en particulier vers les gouttelettes lipidiques (Rambold et al., 2015). L'export des lipides des lysosomes est réduit dans les cellules *Spq11<sup>-/-</sup>* ce qui pourrait conduire à l'accumulation de lipides observée dans les lysosomes. Les lipides amenés aux lysosomes dans les conditions de cette expérience le sont via le processus autophagique ce qui peut suggérer que les lipides accumulés par les lysosomes proviennent de cette voie cellulaire. Toutefois des expériences menées par la suite dans les cellules indiquent que l'export du cholestérol exogène est lui aussi perturbé dans des conditions basales (Article 3). Ces résultats signifient que le transfert de lipides des lysosomes vers d'autres organites est altéré par la perte de fonction de la spatacsine, indépendamment de l'origine de ces lipides.



**Figure 46: Présence d'agrégats immunoréactif pour la protéine p62 dans le noyau hypoglosse d'une patiente SPG11 décédée à 46 ans avec un âge de début de la maladie à 10 ans. Les flèches noires indiquent les inclusions marquées par p62. Barre d'échelle = 50µm. Modifié depuis (Denora et al., 2016).**

## II) Dysfonctions des lysosomes : Les accumulations de lipides dans les lysosomes et leurs conséquences:

L'étude portant sur la caractérisation du modèle murin de la PSH de type SPG11 et des dysfonctions des lysosomes causées par la perte de fonction de la spatacsine ont mis en évidence des accumulations de lipides dans les lysosomes des cellules *Spg11<sup>-/-</sup>*. Les anomalies de la morphologie des lysosomes (Renvoisé et al., 2014), les augmentations du nombre d'autolysosomes (Chang et al., 2014; Varga et al., 2015) sont probablement la conséquence des défauts de recyclage des lysosomes (Chang et al., 2014). Comme des accumulations de matériels, et en particulier de lipides, peuvent perturber la fonction de machineries protéiques des lysosomes (Platt et al., 2012; Walkley and Vanier, 2009a) nous avons émis l'hypothèse que les accumulations de lipides dans les lysosomes des cellules *Spg11<sup>-/-</sup>* pourraient être à l'origine des dysfonctions de ces organites en absence de spatacsine et en particulier les défauts de recyclage comme cela a été montré dans des cellules de patients atteints par la maladie de Fabry (Yu et al., 2010), maladie caractérisée par des accumulations de globotriaosylceramides (Bird et al., 2017). Pour mieux comprendre les liens entre ces accumulations lipidiques et les autres anomalies des lysosomes, déjà décrits dans des modèles de la pathologie, nous avons cherché à identifier les lipides qui s'y accumulent.

### 1) Nature des lipides qui s'accumulent :

#### (a) Les gangliosides simples :

##### (i) Accumulation de gangliosides simples dans les lysosomes : altération de leur dégradation :

Pour identifier les lipides s'accumulant dans les lysosomes suite à la perte de fonction de la spatacsine nous avons réalisé une analyse par spectrométrie de masse dans des lysats de cortex et dans des fractions cellulaires enrichies en lysosomes. Ces analyses montrent que les gangliosides simples GM2, GM3, GD2 et GD3 s'accumulent dans les lysosomes des cellules du système nerveux des souris *Spg11<sup>-/-</sup>*. Puisque la dégradation des gangliosides se fait principalement dans le système endolysosomal (Sandhoff and Harzer, 2013), il est fortement probable que ces accumulations résultent d'un déficit dans la dégradation des gangliosides et en particulier des gangliosides simples. Ainsi la perte de fonction de la spatacsine pourrait altérer l'activité des enzymes impliquées dans la dégradation de ces molécules (Figure 47). Les niveaux de ces molécules sont moins importantes dans notre modèle que dans des pathologies causées par la perte totale (ou quasi-totale) de l'activité des enzymes qui participent directement à la dégradation des gangliosides (Sandhoff and Harzer, 2013), comme les gangliosidoses à GM2 que sont les maladies de Tay-Sachs et de Sandhoff. Il est donc probable que l'activité de ces enzymes soit seulement réduite dans les cellules *Spg11<sup>-/-</sup>*. Pour

confirmer cette hypothèse il sera nécessaire de doser l'activité de ces enzymes. Lors de leurs dégradation, les gangliosides sont réduits en unité simple (céramide, ose et acide sialique) et ce sont ces molécules qui peuvent être recyclées pour la synthèse de gangliosides dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi (Sandhoff and Harzer, 2013; Xu et al., 2010). Ainsi, il est peu probable que des défauts de la synthèse de gangliosides soient impliqués dans la pathologie, puisque les accumulations sont retrouvées dans les lysosomes. Toutefois, il est possible que leur mauvaise dégradation entraîne, indirectement, une diminution de la quantité de céramides, oses ou acides sialiques disponibles pour la synthèse des gangliosides dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. La quantité de céramides est par ailleurs réduite dans les lysats de cortex des souris mutantes âgées de 8 mois ce qui pourrait être le reflet d'un tel mécanisme. En plus des céramides, les niveaux de plusieurs lysoglycérophospholipides sont diminués, cela pourrait refléter la mort neuronale.

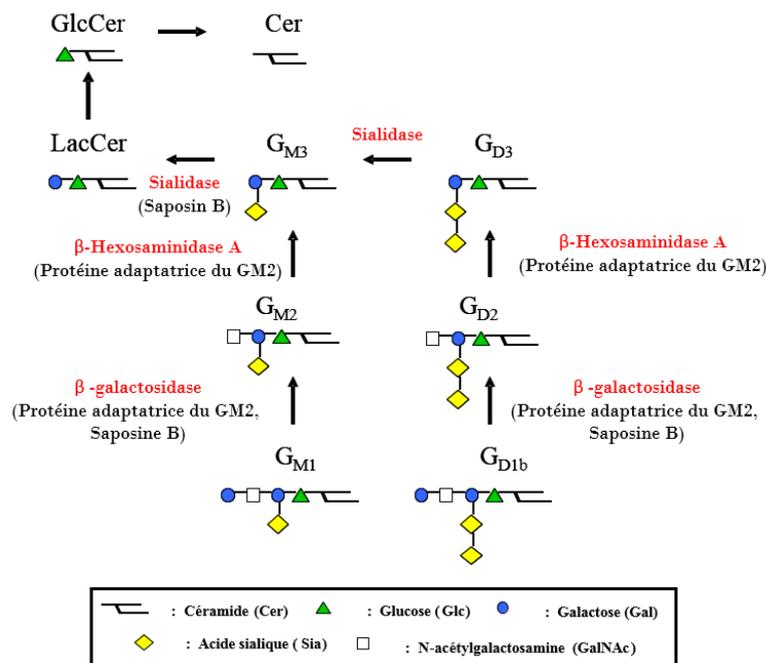


Figure 47: Représentation simplifiée de la dégradation des gangliosides simples (GM2, GM3, GD2 et GD3). Les enzymes de dégradation sont écrites en rouge et les protéines non-enzymatiques participant au processus sont inscrites entre parenthèses.

(ii) Accumulation du ganglioside GM2 dans d'autres pathologies :

Le GM2 est le ganglioside simple qui s'accumule le plus dans notre modèle murin de la PSH de type SPG11 et dans les lysosomes des cellules *Spg11*<sup>-/-</sup>. C'est pour cela que nous avons conduit nos expériences en le prenant comme marqueur. L'expression de ce ganglioside est faible dans des conditions normales (Walkley et al., 1995). Toutefois, des accumulations de GM2 ont été retrouvées dans un nombre important de maladies (ou modèles de maladies) du système nerveux telles que les gangliosidoses à GM2 (Karimzadeh et al., 2014; Sandhoff and Harzer, 2013), la

maladie de Niemann-Pick de type C (Trilck et al., 2017), de type A (Walkley and Vanier, 2009a), la maladie d'Alzheimer (Kalanj et al., 1991; Kracun et al., 1992; Molander-Melin et al., 2005; Pernber et al., 2012), les mucopolysaccharidoses de types I, II, IIIa et VI (McGlynn et al., 2004; Micsenyi et al., 2009; Walkley and Vanier, 2009a; Walkley et al., 2005), l' $\alpha$ -mannosidose (Damme et al., 2011), dans un modèle murin de neurodégénérescence induite par l'éthanol (Saito et al., 2012), dans des neurones embryonnaires corticaux de rats exposés à une toxicité induite par le glutamate (Park et al., 2016a) ou encore dans des drosophiles mutées pour le gène *spin* (Usui-Aoki et al., 2002). A l'exception des gangliosidoses à GM2, les accumulations de GM2 semblent être secondaires à une autre accumulation dans les MSL (Walkley and Vanier, 2009a) ou même être le reflet d'une souffrance ou mort neuronale. Dans les MSL, l'accumulation de matériels dans les lysosomes perturbe leur fonctionnement et entraîne l'accumulation secondaire d'autres composés, qui à leur tour peuvent conduire à des dysfonctions des lysosomes (Platt et al., 2012; Walkley and Vanier, 2009a).

Ainsi, il a été montré que des accumulations primaires de cholestérol pourraient conduire à une accumulation secondaire du GM2 en inhibant son catabolisme (Anheuser et al., 2015; Trilck et al., 2017). Un tel mécanisme pourrait être à l'œuvre dans la PSH de type SPG11. Comme des augmentations des niveaux de ce gangliosides sont retrouvées dans des cas de neurodégénérescence induite par une toxicité (glutamate ou éthanol par exemple) ou dans la maladie d'Alzheimer qui ne sont, a priori, pas caractérisées par une dysfonction primaire des lysosomes, il est possible que des accumulations de GM2 soient induites dans des conditions de stress ou par l'altération de voies cellulaires. Le GM2 pourrait alors être un marqueur de la souffrance cellulaire, ce qui n'exclut pas un rôle délétère de ces accumulations dans ces pathologies.

## **(b) Le cholestérol :**

### **(i) Accumulation de cholestérol dans les lysosomes :**

Les gangliosides sont principalement exprimés dans le système nerveux central. Toutefois, les lysosomes des fibroblastes embryonnaires murins présentent également des altérations. La tubulation est en effet réduite dans ces cellules et j'ai remarqué que les lysosomes sont, en moyenne, positionnés plus proches du noyau. Il a été montré que des accumulations de cholestérol dans les lysosomes induisent le rapprochement de ces organites vers le noyau (Li et al., 2016; Rocha et al., 2009) (Figure 48). Le cholestérol est accumulé dans les lysosomes dans un grand nombre de MSL (Fraldi et al., 2010; Kwiatkowska et al., 2014; Platt et al., 2012; Rappaport et al., 2016) et les lysosomes sont positionnés plus proche du noyau que la normale dans un nombre important de ces pathologies (Samie and Xu, 2014; Xu and Ren, 2015). Par l'utilisation de sondes fluorescentes

marquant le cholestérol j'ai confirmé que les lysosomes des cellules *Spg11<sup>-/-</sup>* contiennent plus de cholestérol que ceux des cellules sauvages. Ces augmentations sont relativement légères par rapport à celles observées dans la maladie de Niemann-Pick de type C dans laquelle les transporteurs du cholestérol NPC1 et NPC2 sont déficients (Infante et al., 2008; Kwiatkowska et al., 2014), ce qui suggère que la perte de spatacsine perturbe directement ou indirectement le trafic du cholestérol mais ne le bloque pas totalement. Cette hypothèse est renforcée par le fait que le niveau de cholestérol à la membrane plasmique est diminué en absence de spatacsine tandis que les niveaux cellulaires totaux sont inchangés. On pourrait donc être dans un contexte de mauvaise répartition du cholestérol dans la cellule, ce qui peut avoir des conséquences sur de nombreuses fonctions cellulaires dans lesquelles le cholestérol est important, telles que l'endocytose (Lajoie and Nabi, 2010; Yue and Xu, 2015), l'organisation des membranes (Kraft, 2013) ou encore un possible rôle dans l'import de calcium extracellulaire (Derler et al., 2016; Pacheco et al., 2016).

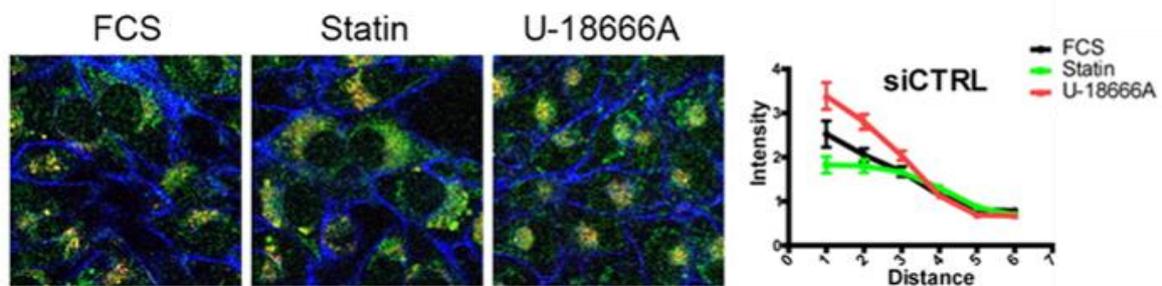


Figure 48: Position des lysosomes (en vert, marquage CD63) par rapport au noyau dans des conditions normales (FCS), d'inhibition de la synthèse du cholestérol (Statine) ou d'accumulation de cholestérol dans les lysosomes (U-18666A). Les courbes représentent l'intensité du marquage des lysosomes en fonction de la distance au noyau. (Rocha et al., 2009).

En ce qui concerne la position des lysosomes par rapport au noyau, plusieurs questions restent en suspens : les traitements qui diminuent les niveaux de cholestérol dans les lysosomes des cellules *Spg11<sup>-/-</sup>* ne permettent pas de rétablir la bonne position des lysosomes dans ces cellules (données non présentées). Cela pourrait signifier que d'autres mécanismes sont en jeu dans notre modèle. Des altérations dans la fonction ou l'expression de moteurs protéiques, qui sont impliqués dans le mouvement des lysosomes, pourraient par exemple causer un tel phénotype (Pu et al., 2016). Cela peut aussi signifier que l'accumulation de cholestérol est une conséquence d'une perturbation de la dynamique de fonctionnement des lysosomes.

#### (ii) Accumulations de cholestérol dans les lysosomes des cellules du système nerveux central :

Les analyses lipidomiques réalisées sur les lysats de cortex des souris à 8 mois n'ont montrés aucune différence significative entre les animaux sauvages et mutants en ce qui concerne les niveaux de

cholestérol. Pour les lysats de cortex cela pourrait s'expliquer par deux raisons. Premièrement une augmentation dans les lysosomes pourrait être masquée par une diminution causée par la mort neuronale qui a lieu dans les souris *Spg11<sup>-/-</sup>*. Un phénomène similaire a lieu dans la maladie de Niemann-Pick de type C où les niveaux de cholestérol dans les cerveaux sont diminués en raison d'une perte de myéline (Xie et al., 2000). En effet, une grande partie (~70%) du cholestérol du cerveau est situé dans la myéline (Peake and Vance, 2010). De plus, les marquages et les dosages du cholestérol intracellulaire total ne montrent aucune différence significative entre les cellules sauvages et les cellules mutantes. Il semble que la répartition du cholestérol soit affectée par la perte de fonction de la spatacsine et que la diminution des niveaux de cholestérol dans la membrane plasmique et l'augmentation dans les lysosomes se neutralisent en termes de quantité totale de cholestérol dans les cellules.

Toutefois, les expériences menées par Alexandre Pierga, étudiant en master 2, montrent que les niveaux de cholestérol sont plus élevés dans les lysosomes des neurones embryonnaires *Spg11<sup>-/-</sup>* que dans ceux des cellules hétérozygotes (ces cellules ne présentent aucun phénotype apparent et la PSH de type SPG11 est une maladie à transmission récessive suggérant que ces cellules peuvent être utilisées comme contrôle). L'altération du métabolisme du cholestérol semble donc présente et des marquages complémentaires devront être réalisés pour confirmer ces résultats et établir laquelle des accumulations observées (gangliosides ou cholestérol) est primaire dans les lysosomes de ces cellules.

### (iii) Accumulations de cholestérol dans d'autres maladies :

Comme pour les gangliosides (et en particulier le GM2), des accumulations de cholestérol dans les lysosomes ou des mauvaises répartitions du cholestérol dans les cellules sont retrouvés dans un grand nombre de pathologies. Par exemple, la maladie de Niemann-Pick de type C fait intervenir une accumulation primaire de cholestérol (Infante et al., 2008; Vanier, 2010; Xie et al., 2000) tandis que des accumulations, probablement secondaires, sont retrouvées dans un grand nombre d'autres pathologies. Tous les mécanismes ne sont pas encore élucidés mais pourraient résulter de la perturbation de l'efflux du cholestérol des lysosomes par l'accumulation d'autres substances en amont. Comprendre les mécanismes mis en jeu dans ces accumulations ainsi que les conséquences pour les cellules et les organismes représentent un enjeu important pour le développement de potentielles pistes thérapeutiques.

### (c) La PSH de type SPG11 est-elle une MSL ?

Considérant que la perte de fonction de la spatascine est responsable de dysfonctions des lysosomes (Branchu et al., 2017; Chang et al., 2014; Renvoisé et al., 2014; Varga et al., 2015) et que l'une d'elles est l'accumulation de lipides dans les lysosomes (Branchu et al., 2017), on peut se demander si la pathologie peut être classée dans le groupe des MSL. Les MSL sont des maladies d'origine génétique, qui sont caractérisées par l'accumulation de matériels (lipides et/ou sucres le plus souvent) au sein des lysosomes en réponse à la perte de fonction d'une enzyme lysosomale mais aussi de protéines sans activité enzymatique (Platt et al., 2012; Samie and Xu, 2014; Vitner et al., 2010). La maladie se déclare le plus souvent lors de l'enfance et est caractérisée dans près de deux tiers des cas par une atteinte du système nerveux (Vitner et al., 2010). Sur l'ensemble de ces points la PSH de type SPG11 présente des caractéristiques de MSL. Toutefois, dans des modèles animaux de MSL les altérations des lysosomes apparaissent plus rapidement et la durée de vie des animaux est souvent réduite (Lawson and Martin, 2016; Maue et al., 2012), ce qui n'est pas le cas pour le modèle murin *Spq11<sup>-/-</sup>*. De plus, même si il a été proposé des fonctions au niveau des lysosomes pour la spatascine (Chang et al., 2014) la localisation et les fonctions précises de la protéine sont toujours inconnues et les altérations des lysosomes pourraient résulter de perturbations d'autres voies cellulaires. Elucider les fonctions précises de la protéine pourrait apporter des réponses supplémentaires. Récemment, il a été montré que la forme SPG48 des PSH, qui résulte de la perte de fonction d'une protéine qui interagit avec la spatascine, est caractérisée par des accumulations de matériels dans le système endolysosomal (Hirst et al., 2015) ce qui a amené les auteurs à proposer que cette pathologie pourrait faire partie des MSL. Si la PSH de type SPG11 est une MSL, il est probable que les accumulations surviennent en réponse à des anomalies de transport de lipides ou à la perturbation du trafic des membranes comme cela est la cas dans plusieurs de ces maladies (Platt et al., 2012). Enfin, la distinction clinique entre ces deux groupes de maladies est parfois délicate, certains patients ont été suspectés d'être affectés par des PSH avant que le diagnostic d'une MSL ne soit définitivement posé (Müller vom Hagen et al., 2014; Novarino et al., 2014). Il serait alors intéressant de vérifier si des accumulations de lipides dans le système lysosomal se produisent dans d'autres PSH et en particulier celles dans lesquelles est présente une altération du métabolisme lipidique comme par exemple les PSH de type 4, 3 ou 31 (Klebe et al., 2015).

## 2) Accumulation primaire de lipides:

Les gangliosides, en particulier GM2, et le cholestérol sont co-accumulés dans un grand nombre de pathologies. C'est notamment le cas dans les mucopolysaccharidoses de types I, II, IIIa et IV (McGlynn et al., 2004; Micsenyi et al., 2009; Walkley and Vanier, 2009a; Walkley et al., 2005), l' $\alpha$ -mannosidose (Damme et al., 2011) ou encore dans la maladie de Niemann-Pick de type C (Sleat et al., 2004; Zervas et al., 2001). Ces données suggèrent qu'il existe un lien entre ces deux accumulations.

### (a) Les accumulations de cholestérol et gangliosides sont liées dans la PSH de type SPG11 :

Dans la PSH de type SPG11 ces accumulations sont liées puisque la diminution de l'import de calcium extracellulaire et l'augmentation de la libération de calcium des lysosomes via TRPML1 réduisent à la fois les accumulations de cholestérol et de ganglioside GM2. Elles pourraient alors être la conséquence d'une altération de l'homéostasie calcique cellulaire ou provenir directement de la perte de fonction de la spatacine et arriver conjointement de manière indépendante. Une autre hypothèse est que l'accumulation de l'un de ces lipides soit responsable de l'accumulation, secondairement, de l'autre. Enfin nous ne pouvons pas exclure que ces deux accumulations soient secondaires à une autre (de nature lipidique, protéique ou autre) qui serait encore à découvrir.

### (b) Arguments en faveur d'une accumulation primaire de cholestérol :

J'ai démontré que les défauts du métabolisme du ganglioside GM2 et du cholestérol sont présents dans les neurones et les fibroblastes embryonnaires en culture. Il sera intéressant de vérifier si les agrégats autofluorescents qui contiennent du GM2, que nous avons mis en évidence dans les cerveaux des souris *Spg11<sup>-/-</sup>*, contiennent aussi du cholestérol. De plus, le blocage de l'efflux du cholestérol des lysosomes par un traitement au U18666a induit une accumulation spectaculaire du GM2 dans les lysosomes des cellules. Ces accumulations ne semblent apparaître que dans des lysosomes contenant des niveaux élevés de cholestérol. Ces résultats sont en accord avec une accumulation secondaire du GM2 qui ferait suite à une augmentation des niveaux de cholestérol dans les cellules (Anheuser et al., 2015; Sandhoff, 2016; Trilck et al., 2017). Un tel mécanisme pourrait avoir lieu dans la maladie de Niemann-Pick de type C ou des accumulations conjointes de cholestérol et de GM2 sont retrouvées (Walkley and Vanier, 2009a)(Figure 49).

Plusieurs points sont encore flous. Dans nos conditions, l'accumulation massive de cholestérol induite par le U18666a n'induit pas d'accumulation de GM2 dans tous les lysosomes (Figure 42). De plus, environ la moitié des cellules ne présentent aucune augmentation du GM2 dans leurs lysosomes, alors que les accumulations de cholestérol sont présentes dans toutes les cellules. Ceci pourrait être dû à une hétérogénéité des niveaux de gangliosides dans les fibroblastes, cellules qui ont par ailleurs des niveaux faibles de ces glycolipides. La réalisation de la même expérience en utilisant des neurones en culture pourrait apporter un début de réponse. Les accumulations de GM2 rapportées dans la maladie de Niemann-Pick de type C n'auraient pas nécessairement lieu dans les mêmes structures que les accumulations de cholestérol (Walkley and Vanier, 2009b; Zhou et al., 2011).

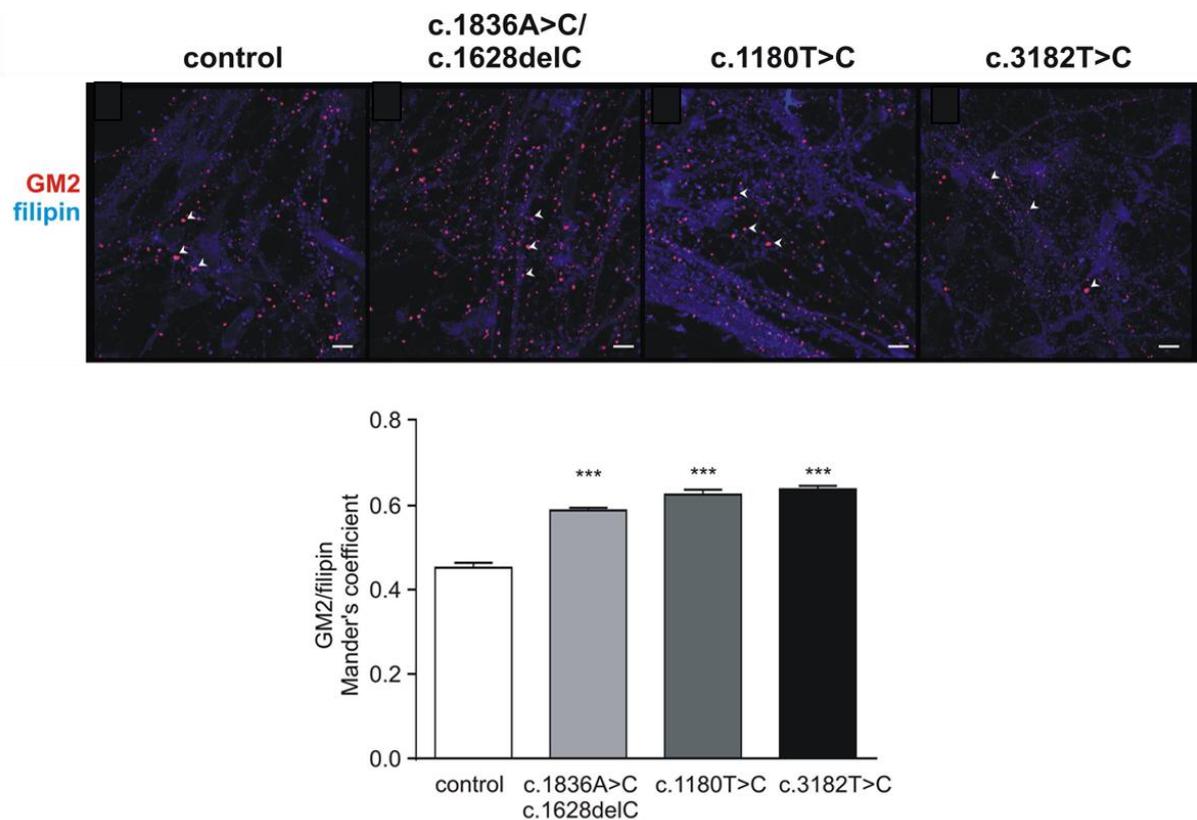


Figure 49: Co-marquage du cholestérol (filipin, bleu) et du ganglioside GM2 (rouge) dans des neurones différenciés à partir de cellules souches à pluripotence induite produites à partir de fibroblastes de patients atteints par la maladie de Niemann-Pick de type C. Les différentes cellules sont nommées par la ou les mutations présentes chez les patients. La colocalisation entre le GM2 et le cholestérol dans ces cellules est évaluée à l'aide du coefficient de Mander. (Trilck et al., 2017).

Toutefois, les résultats que j'ai obtenus montrent que l'accumulation de GM2 peut être forcée par l'inhibition de l'efflux du cholestérol des lysosomes. A ce jour aucun effet du U18666a n'a été décrit sur le catabolisme des gangliosides suggérant que les accumulations de GM2 sont bien la conséquence de l'augmentation des niveaux de cholestérol dans les lysosomes dans ces conditions.

Réduire les accumulations de cholestérol dans les lysosomes en utilisant des inhibiteurs de la biosynthèse du cholestérol comme la simvastatine (Xu et al., 2017) ou par des molécules comme la Methyl- $\beta$ -cyclodextrine (Li et al., 2017b) et évaluer si cela induit une diminution des accumulations de gangliosides dans les cellules *Spg11<sup>-/-</sup>* pourrait apporter un argument supplémentaire en faveur d'une accumulation primaire de cholestérol.

### (c) Arguments en faveur d'une accumulation primaire de gangliosides :

Je n'ai obtenu aucun résultat indiquant que les accumulations de gangliosides simples pourraient être à l'origine des défauts dans le métabolisme du cholestérol dans les cellules *Spg11<sup>-/-</sup>*. La manipulation sélective des niveaux de gangliosides dans les cellules et plus particulièrement dans les lysosomes, couplée à la mesure des niveaux de cholestérol dans ces organites pourrait permettre de répondre à cette question. Nous pourrions ainsi diminuer les accumulations de gangliosides dans les cellules par des traitements au miglustat ou par inhibition de l'expression de la GM3 synthase, et réaliser des marquages du cholestérol. Inversement, nous pourrions induire l'augmentation des niveaux de gangliosides simples en diminuant l'expression de la neuraminidase 1 et observer l'effet sur les accumulations de cholestérol dans les lysosomes.

Des croisements de souris mutantes pour le gène *Npc1* avec des souris mutantes pour le gène *GalNAcT* (qui code pour une protéine impliquée dans la synthèse du GM2 et de gangliosides complexes) induit une réduction des accumulations de cholestérol dans le cerveau (Figure 50) (Liu et al., 2000). Ceci suggère que, dans le système nerveux central, l'agrégation de gangliosides a une influence sur celle de cholestérol. Ces réductions conjointes de cholestérol et de gangliosides n'améliorent pas le phénotype neurodégénératif de ces souris, ce qui pourrait signifier que la diminution des accumulations de cholestérol n'est pas totale ou que d'autres mécanismes sont en jeu.

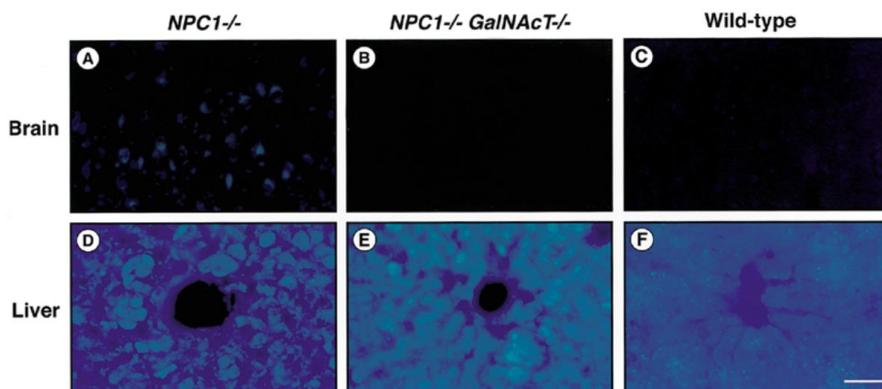


Figure 50 : Marquage du cholestérol (par la filipine) dans le cerveau (cortex cérébral) et le foie de souris âgées de 2 mois mutées respectivement pour les gènes *Npc1*, *Npc1/GalNAcT* ou sauvages. Barre d'échelle = 50 $\mu$ m (Liu et al., 2000).

Ainsi, la relation entre les accumulations de ces deux lipides dans les lysosomes est probablement complexe et pourrait intervenir dans les deux sens voire même être indépendantes dans notre cas. Etant donné que des accumulations de cholestérol et de gangliosides sont retrouvées dans un grand nombre de pathologies, principalement des maladies de surcharge des lysosomes (Walkley and Vanier, 2009b, 2009a), il est très important de comprendre les liens entre ces accumulations et leur origine en comprenant le rôle joué par l'absence de spatacsine dans ces processus. Comprendre leurs conséquences physiopathologiques dans les maladies humaines est aussi très important pour déterminer quels types de traitements seront les plus adaptés.

### **3) Les conséquences physiopathologiques des accumulations de lipides :**

#### **(a) Accumulation de gangliosides et cholestérol et perturbation du processus de reformation des lysosomes :**

##### **(i) Perturbation du recyclage des lysosomes dans la PSH de type SPG11 :**

La perte de fonction de la spatacsine induit la persistance d'autolysosomes ainsi que la diminution du nombre de tubules émanant de lysosomes dans les cellules (Figure 51A-C). Ceci suggère que la protéine est importante pour le recyclage des lysosomes par l'ALR. La présence de matériels non digérés dans les autolysosomes peut perturber leur recyclage, qui est par ailleurs altéré dans plusieurs MSL (Platt et al., 2012; Yu et al., 2010). La perte de fonction de la protéine spinster induit des accumulations de glucides dans les lysosomes et pourrait bloquer leur recyclage de cette manière puisque l'accumulation de matériels dans les lysosomes empêcherait la réactivation de la protéine mTOR et la mise en place de l'ALR (Rong et al., 2011). La perturbation du recyclage observée en absence de spatacsine pourrait alors résulter d'un mécanisme similaire mais nous ne savons pas sous quelle forme les gangliosides s'accumulent (membranes, agrégats, etc.). De plus, nous avons remarqué que les accumulations de gangliosides étaient principalement retrouvées dans des autolysosomes, suggérant que les lipides pourraient altérer leur recyclage. Un rôle moléculaire de la spatacsine, comme proposé précédemment (Chang et al., 2014), dans la reformation des lysosomes ne peut cependant pas être exclu.

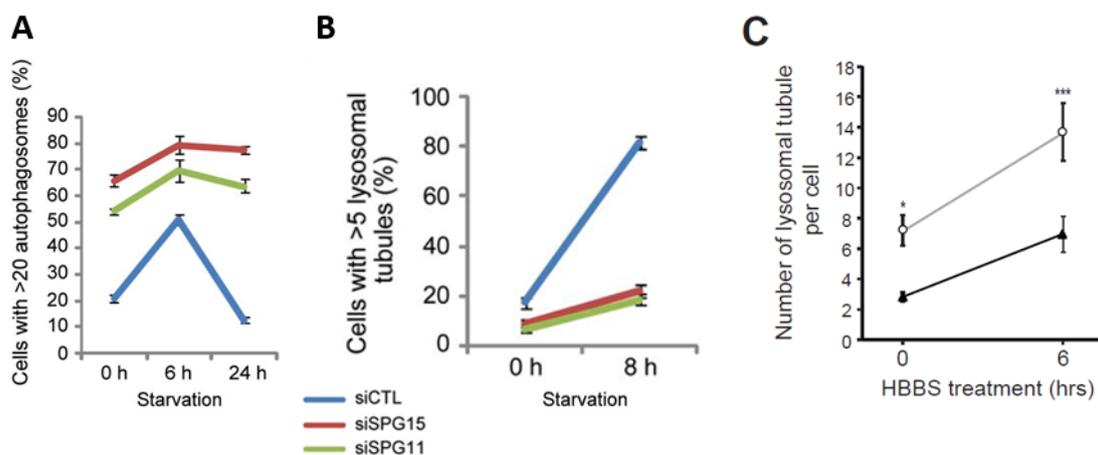


Figure 51 : Altération de l'ALR dans des modèles cellulaires de la PSH de type SPG11. (A –B) La diminution de l'expression de la spatacsine (siSPG11, vert) et de la spastizine (siSPG15, rouge) induit la persistance d'autolysosomes (A) et la diminution du nombre de tubules de lysosomes (B) (Chang et al., 2014). (C) J'ai confirmé que la perte de fonction de la spatacsine diminue le nombre de tubules de lysosomes dans les fibroblastes murins (donnée non publiée) même après une privation de nutriments (HBSS treatment). \*= $p < 0,05$  ; \*\*\*= $p < 0,001$ .

#### (ii) Impact des accumulations de lipides sur le recyclage des lysosomes :

Pour vérifier les conséquences de l'accumulation de gangliosides, en particulier GM2, sur la reformation des lysosomes, j'ai inhibé leur synthèse, ce qui diminue leurs niveaux dans les lysosomes. J'ai aussi forcé leur accumulation dans les lysosomes en inhibant l'expression d'une enzyme impliquée dans leur dégradation. La diminution des niveaux de GM2 dans les lysosomes corrige les accumulations d'autolysosomes tandis que l'augmentation du GM2 dans ces organites augmente l'accumulation d'autolysosomes. Ces résultats suggèrent que l'accumulation de GM2 dans les autolysosomes perturbe leur recyclage. Il serait très intéressant de confirmer ces résultats sur des modèles de gangliosidoses à GM2 dans lesquelles les accumulations de GM2 sont plus importantes (Karimzadeh et al., 2014; Sandhoff, 2012) ainsi que dans les autres pathologies pour lesquelles le GM2 est accumulé secondairement. Enfin le rôle précis de chacun des gangliosides (GM2, GM3, GD2 et GD3) devra être étudié.

En ce qui concerne l'impact des accumulations de cholestérol, leur diminution dans les lysosomes, par inhibition de l'import de calcium extracellulaire, corrige partiellement le recyclage des lysosomes dans les fibroblastes. Mais cela pourrait être dû à une diminution conjointe du GM2. En effet, l'inhibition de l'import de  $Ca^{2+}$  extracellulaire semble aussi réduire les niveaux de GM2 dans les lysosomes. Le traitement au U18666a réduit fortement la tubulation mais conduit à une augmentation importante du cholestérol et du GM2 dans les cellules. Toutefois, dans ce cas, la

perturbation de l'ALR pourrait passer par un mécanisme légèrement différent. En effet, la tubulation est réduite pour l'ensemble des cellules tandis que l'accumulation de GM2 n'a lieu que dans la moitié d'entre elles et le traitement n'augmente pas le nombre d'autolysosomes (données non présentées). La fusion des lysosomes avec les autophagosomes est altérée dans la maladie de Niemann-Pick de type C (Lloyd-Evans et al., 2008; Platt et al., 2012). La reformation des lysosomes est aussi perturbée par la perte de fonction de NPC2 (Goldman and Krise, 2010). Ces données suggèrent que l'accumulation de cholestérol perturbe la reformation des lysosomes mais étant donné que le GM2 s'accumule aussi dans la maladie de Niemann-Pick de Type C (Sleat et al., 2004; Trilck et al., 2017) des expériences complémentaires sont nécessaires pour distinguer l'impact précis du GM2 et du cholestérol sur le recyclage des lysosomes. Dans le cas de la PSH de type SPG11 il sera crucial de vérifier si la modulation des niveaux de GM2 a un effet sur le trafic du cholestérol.

(iii) Mécanisme mis en jeu dans la perturbation du recyclage des lysosomes par les accumulations de lipides :

Pour comprendre comment l'accumulation de GM2 perturbe le recyclage des lysosomes, j'ai regardé la localisation cellulaire d'une protéine essentielle à la reformation des lysosomes : la clathrine (Rong et al., 2012). De manière intéressante le recrutement de la clathrine au niveau des lysosomes est plus fort dans les cellules *Spg11<sup>-/-</sup>*. Ce phénotype peut être corrigé par un traitement au miglustat et peut être déclenché quand l'accumulation de GM2 est provoquée dans les lysosomes de neurones sauvages. Le recrutement de la clathrine est augmenté d'environ 30% dans les lysosomes contenant du GM2 en présence ou absence de la spatacsine. La perturbation de l'ALR dans les cellules *Spg11<sup>-/-</sup>* semble plus être la conséquence de l'accumulation de lipides que de la perte de fonction de la spatacsine. Nous avons aussi mis en évidence que le recrutement de la dynamine 1 est bloqué en absence de spatacsine. La dynamine 2 participe à la scission des tubules lors de l'ALR (Figure 52) (Schulze et al., 2013). Un rôle similaire peut être supposé pour la dynamine 1 qui est l'isoforme la plus exprimée dans les neurones. Le recrutement des protéines participant à l'initiation de la reformation semble avoir lieu, mais pourrait ne pas se faire dans de bonnes conditions. L'accumulation de lipides pourrait perturber la mise en place adéquate du réseau de clathrine, empêchant le recrutement des protéines successives (Sridhar et al., 2013), dont la dynamine. L'augmentation de la clathrine pourrait aussi être le témoin d'une tentative de compensation des cellules pour forcer le recyclage.

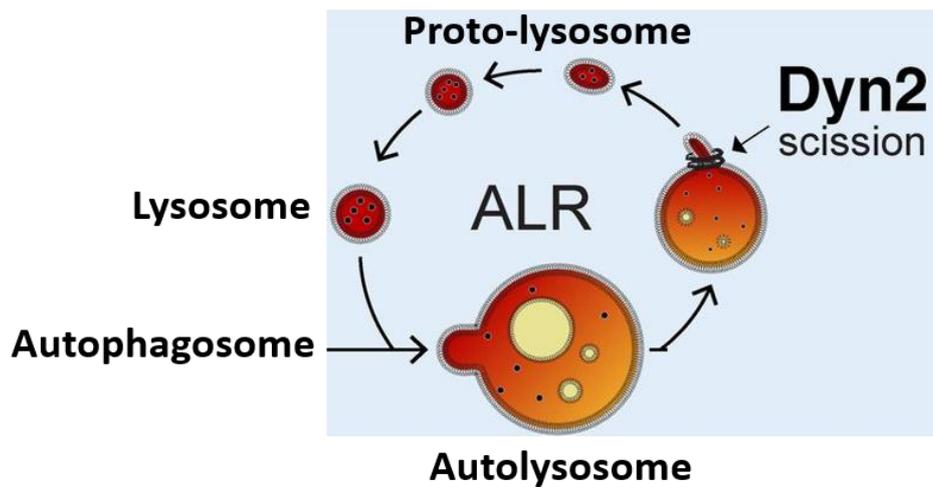


Figure 52 : Représentation du rôle de la dynamine dans la scission des tubules lors de la reformation des lysosomes (Schulze et al., 2013).

Le mécanisme par lequel l'accumulation du GM2 et/ou de cholestérol perturbe le recrutement des protéines finales de l'ALR est encore inconnu. Toutefois, il est probable que le recrutement ou le bon fonctionnement d'autres protéines impliquées dans ce mécanisme soient perturbés. Par exemple, cela pourrait être le cas de la protéine AP-2 qui interagit avec des protéines, contenant des domaines BAR (Bin–Amphiphysin–Rvs) qui sont impliquées dans des processus de déformation et de tubulation de membranes (Figure 53B) (Dawson et al., 2006; Stanishneva-Konovalova et al., 2016; Takei et al., 1999). Cela pourrait avoir pour conséquence de bloquer le recrutement de la dynamine qui par ailleurs interagit aussi avec des protéines contenant des domaines BAR (Takei et al., 1999). Ainsi, les mécanismes utilisés par la cellule pour la reformation des lysosomes apparaissent proches de ceux d'autres mécanismes mieux connus comme notamment le mécanisme d'endocytose dépendante de la clathrine (Figure 53A) (Chen and Yu, 2017). Ces hypothèses sont à explorer en analysant le recrutement d'AP-2 par exemple.

L'activité de la protéine mTOR devra aussi être évaluée. En effet, cette protéine est inhibée lors du déclenchement de l'autophagie et doit être réactivée pour la reformation des lysosomes (Yu et al., 2010). L'accumulation de lipides dans les lysosomes pourrait perturber cette réactivation. Toutefois, mTOR participe à un très grand nombre de fonctions cellulaires (Cang et al., 2013; Goberdhan et al., 2016; Perera and Zoncu, 2016; Settembre et al., 2012) ce qui peut rendre l'interprétation des résultats compliquée si on se base uniquement sur l'activité kinase de la protéine.

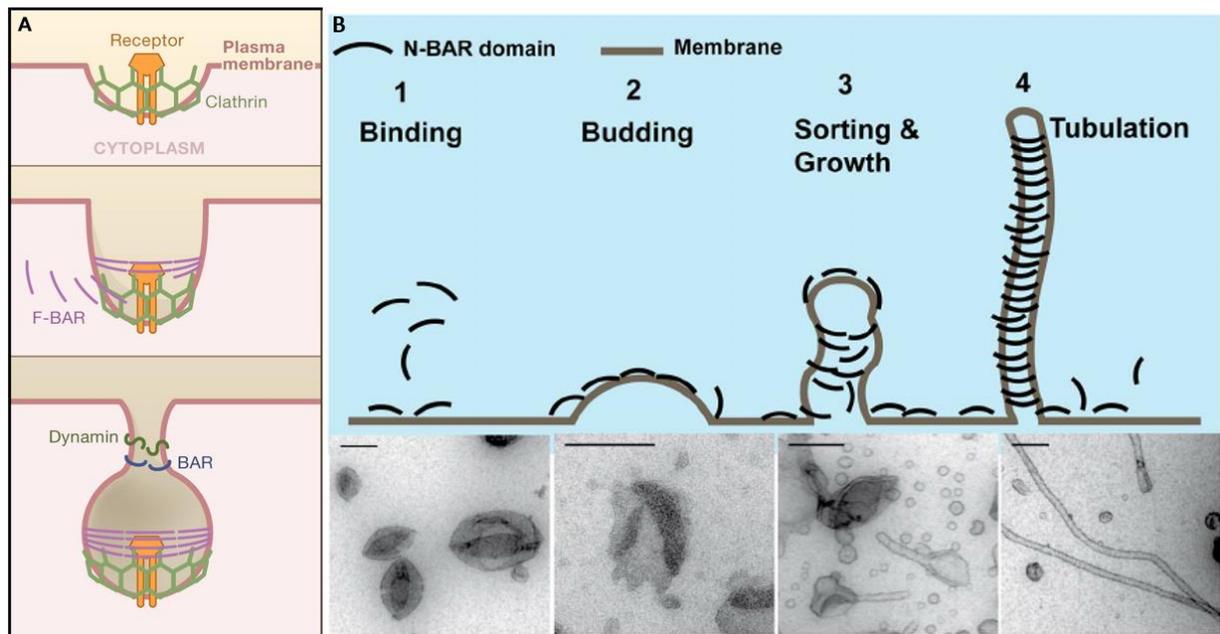


Figure 53 : (A) Lors de la mise en place de la vésicule d'endocytose, des protéines contenant des domaines BAR participent à la déformation des membranes et au maintien de ces structures mais aussi à la scission des vésicules avec l'aide de la dynamine (Fütterer and Machesky, 2007). (B) Les domaines BAR (ici N-BAR) induisent la tubulation des membranes *in vitro* (Wu et al., 2014).

(iv) Autres pathologies avec accumulations de GM2 et de cholestérol :

L'étude de ces mécanismes dans des MSL où l'on retrouve des accumulations de GM2 et/ou de cholestérol dans les lysosomes sera crucial pour déterminer si les observations que nous avons faites sont valables pour toutes les pathologies avec accumulations de GM2, comme le suggère les résultats que j'ai obtenu par la modulation des niveaux de gangliosides dans des cellules sauvages, ou si cela n'est vrai que dans le cas d'une perte de fonction de la spatacsine. Toutefois, la reformation des lysosomes est altérée dans plusieurs de ces pathologies (Platt et al., 2012) et des désordres de l'autophagie sont aussi retrouvés dans une grande partie de ces maladies (Menzies et al., 2017; Platt et al., 2012) et pourraient être la conséquence d'une perturbation du recyclage des lysosomes.

**(b) Les conséquences des accumulations de lipides sur la survie des neurones :**

(i) La mort neuronale *in vitro* :

Pour évaluer si les accumulations de lipides (et la perturbation de la reformation des lysosomes qui en résulte) ont une incidence sur la survie des neurones en culture j'ai soumis les neurones à un stress induit par le glutamate. Dans des conditions basales, les neurones sauvages et mutants ne montraient pas de différence de mortalité, ce qui était attendu puisque la perte neuronale est tardive et ne commence qu'entre 4 et 8 mois d'âge pour les souris *Spg11<sup>-/-</sup>* (Branchu et al., 2017). La mort

neuronale induite par le glutamate pourrait être impliquée dans plusieurs maladies neurodégénératives (Lewerenz and Maher, 2015) et de manière intéressante des traitements au glutamate augmentent les niveaux de GM2 dans des neurones en culture (Park et al., 2016a). Dans nos conditions, le traitement augmente aussi les niveaux de la protéine p62 dans les cellules mutantes suggérant que les perturbations du recyclage des lysosomes pourraient exacerber l'accumulation d'autolysosomes et expliquer la plus grande sensibilité des cellules *Spg11<sup>-/-</sup>* au glutamate.

L'accumulation induite de GM2 par inhibition de la neuraminidase 1 sensibilise les neurones à la mort induite par le glutamate. Ces résultats suggèrent que les accumulations de gangliosides dans les lysosomes des neurones ont un effet délétère sur leur survie.

#### (ii) La reformation des lysosomes dans les neurones :

Il est important de rappeler que le processus d'ALR tel qu'il a été décrit (Yu et al., 2010) n'a, à ma connaissance, jamais été directement observé dans les neurones en culture. La reformation des lysosomes après autophagie fait intervenir la tubulation de la membrane des autolysosomes. Je n'ai jamais observé cette tubulation dans les neurones. Cela pourrait être dû au fait que l'autophagie ne semble pas être déclenchée par une privation en d'acides aminés dans les neurones en culture. La privation n'induit, en effet, aucune augmentation des niveaux de p62 ou de la protéine LC3-II dans ces cellules. Il a été proposé que les mécanismes d'induction de l'autophagie pourraient être différents entre les neurones et les cellules non neuronales (Yue et al., 2009).

La reformation des lysosomes dans les neurones pourrait passer par une vésiculation de la membrane plutôt que par une tubulation, comme c'est le cas aussi dans des fibroblastes en conditions basales (Sridhar et al., 2013). En absence de tubulation, j'ai évalué le recyclage des lysosomes de manière indirecte en mesurant les quantités d'autolysosomes : une accumulation d'autolysosomes traduisant des problèmes de recyclage et inversement. La reproduction de ces expériences en utilisant des fibroblastes, capables de former des tubules dans leurs lysosomes, pourrait confirmer que nous avons bien évalué la reformation des lysosomes. La diminution de l'import de calcium extracellulaire, qui induit une diminution des accumulations de cholestérol et de GM2, réduit le nombre d'autolysosomes et rétablit partiellement la tubulation, ce qui est cohérent avec les résultats obtenus avec les neurones.

#### (iii) La reformation des lysosomes et la neurodégénérescence :

La diminution de la synthèse des gangliosides, et donc de leur accumulation dans les lysosomes, a un effet neuroprotecteur dans notre modèle *in vivo*. Inversement, l'accumulation de GM2 dans les

lysosomes augmente la mortalité de ces cellules lorsqu'elle est induite par un traitement au glutamate. Comme les accumulations de GM2 sont corrélées au recyclage des lysosomes il apparaît que ce processus est important pour la survie des cellules et que sa dysfonction pourrait participer à la neurodégénérescence. Ces résultats sont cohérents avec le fait que des mutations affectant les gènes codant pour les protéines impliquées dans le recyclage des lysosomes (ou dont la perte de fonction perturbe le recyclage) sont responsables de pathologies neurodégénératives. Des mutations des gènes codant pour les sous-unités du complexe AP-4, de la spatacine et de la spastizine sont responsables de PSH (Tesson et al., 2015), des mutations bi-alléliques de *GBA1* provoquent la maladie de Gaucher (Stirnemann et al., 2017) et des mutations du gène *spin* sont responsables d'un phénotype neurodégénératif chez la drosophile (Nakano et al., 2001). Le bon fonctionnement des lysosomes et des mécanismes de l'autophagie est important pour la survie des neurones, et l'altération du recyclage des lysosomes pourrait aboutir à l'accumulation de matériels non dégradés et toxiques dans les neurones (Nixon, 2013). Enfin, la perturbation de l'ALR pourrait conduire à une diminution du nombre de lysosomes compétents dans les cellules, participant là aussi à l'accumulation de matériels dans les cellules. C'est ce mécanisme physiopathologique qui a été proposé dans l'étude du premier modèle murin de la PSH de type SPG11 (Figure 54) (Varga et al., 2015). Le nombre de lysosomes n'est toutefois pas diminué dans les cellules *Spg11*<sup>-/-</sup> dans nos conditions et donc d'autres mécanismes de biogénèse des lysosomes pourraient être à l'œuvre pour compenser les défauts dans l'ALR.

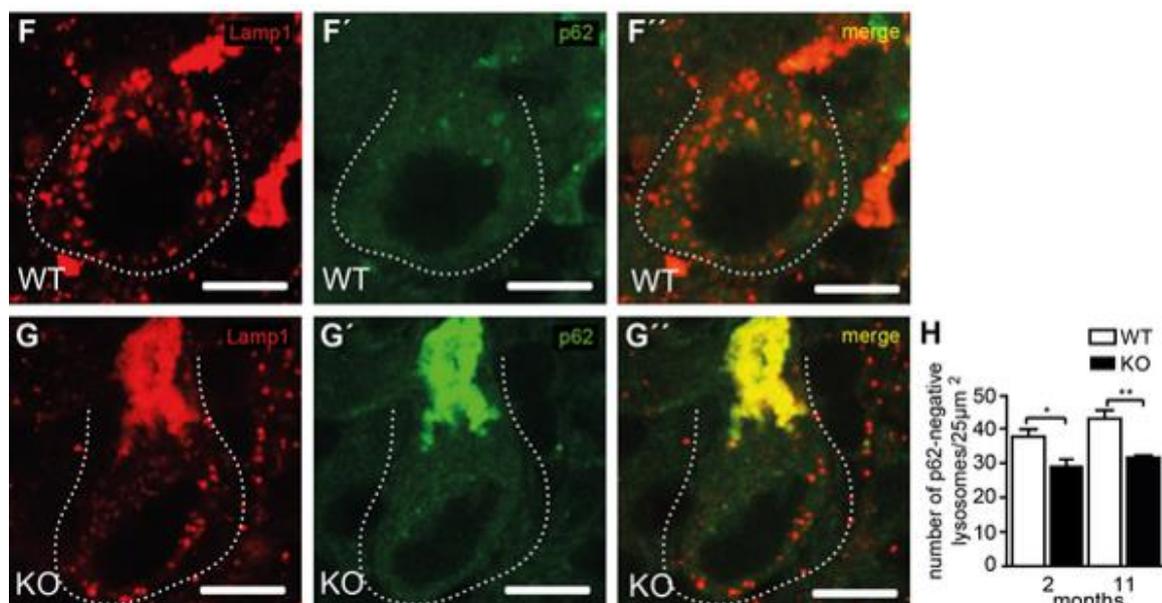


Figure 54 : Déplétion du nombre de lysosomes (marqués par Lamp1 mais pas par p62) dans les cellules de Purkinje de souris âgées de 2 et 11 mois (F-G'') (H) Quantification du nombre de lysosomes dans les cellules de Purkinje des souris sauvages (WT) et *Spg11*<sup>-/-</sup> (KO) (Varga et al., 2015).

Nos résultats suggèrent que rétablir le recyclage des lysosomes en ciblant la synthèse des gangliosides pourrait être une stratégie thérapeutique dans le cadre de la PSH de type SPG11. Considérant le grand nombre de pathologies dans lesquelles des accumulations de gangliosides sont retrouvées (Onyenwoke and Brenman, 2015) et le fait que l'activation de l'autophagie dans les neurones soit une piste thérapeutique très étudiée (Menzies et al., 2017), il sera intéressant de confirmer l'intérêt de ces stratégies dans des modèles *in vivo*.

#### (iv) L'inhibition de la synthèse des gangliosides comme stratégie thérapeutique :

Diminuer les accumulations de gangliosides dans les lysosomes en inhibant leur synthèse est donc une potentielle solution thérapeutique. Cette stratégie est d'ailleurs explorée dans plusieurs MSL dont la maladie de Niemann-Pick de type C dans laquelle des accumulations de gangliosides sont présentes (Lyseng-Williamson, 2014). Les accumulations de lipides s'aggravent avec le temps dans le modèle murin de la PSH de type SPG11 (Branchu et al., 2017) et il est possible que l'inhibition de la synthèse des gangliosides testée à des stades précoces en culture ne permettent pas de réduire ces accumulations mais plutôt de les prévenir. La fenêtre de traitement possible n'a pas encore été établie et notamment si un traitement postérieur à l'apparition des accumulations sera efficace, mais il est probable qu'il faudrait commencer les traitements à un stade précoce de la pathologie. Ainsi, le traitement au miglustat d'un patient atteint par la maladie de Niemann-Pick de type C dès l'âge de 4 mois a permis de stabiliser la maladie et de réduire les symptômes pulmonaires (Usui et al., 2017). Toutefois, de manière générale l'efficacité du miglustat est limitée et son utilisation même est controversée (Di Rocco et al., 2015). Le traitement étant responsable de nombreux effets secondaires (Lyseng-Williamson, 2014). De plus, un traitement au miglustat dans un modèle de souris de la maladie de Sandhoff (gangliosidose à GM2) a induit une augmentation des niveaux de GM2 dans le cerveau mais a tout de même amélioré le phénotype moteur et la durée de vie de ces souris (Ashe et al., 2011). Le mécanisme d'action précis du miglustat reste donc à élucider et son utilisation en thérapeutique humaine n'est pas assez bénéfique pour en faire le traitement de choix dans la PSH de type SPG11. Le développement d'autres molécules dont la spécificité serait meilleure est nécessaire.

Réduire l'expression de la GM3 synthase dans un modèle *in vivo*, qui est en amont de la synthèse de tous les gangliosides, permettrait de vérifier l'efficacité de la stratégie thérapeutique envisagée. Toutefois, une inhibition trop importante de l'enzyme pourrait avoir des effets négatifs. En effet, des modèles de souris invalidés pour le gène codant pour la GM3 synthase ont respectivement présentés des troubles neuropsychologiques (Niimi et al., 2011) et une perte totale d'audition résultant de la dégénérescence de l'organe de Corti (Yoshikawa et al., 2009). Chez l'Homme, des

mutations dans le gène codant pour cette enzyme sont responsables de crises d'épilepsie, de déficit intellectuel (Fragaki et al., 2013; Wang et al., 2016) et même de perte de vision qui résultent d'une atteinte du système nerveux central et du nerf optique (Farukhi et al., 2006).

En résumé, nous avons montré que l'inhibition de la synthèse des gangliosides permet de diminuer les accumulations de gangliosides dans les lysosomes et a un effet neuroprotecteur dans des neurones en culture. Ces résultats sont encourageants et nécessitent d'être poursuivis par des expériences sur un modèle *in vivo* de la PSH de type SPG11 mais le degré et la méthodologie d'inhibition de la synthèse devront être soigneusement régulés pour éviter l'apparition de nouveaux troubles.

### **(c) Accumulations de lipides ou problème de recyclage des lysosomes dans d'autres types de PSH :**

Plusieurs autres formes de PSH sont caractérisées par une altération du métabolisme des lipides (Klebe et al., 2015). Des fibroblastes de patients atteints par les PSH de type SPG15 et SPG48 ont des accumulations de matériels non digérés dans les lysosomes (Hirst et al., 2015; Renvoisé et al., 2014). Les deux protéines codées par les gènes mutés dans ces pathologies interagissent d'ailleurs avec la spatascine (Hirst et al., 2011; Slabicki et al., 2010). Des mécanismes physiopathologiques communs pourraient exister entre ces pathologies, et en particulier avec la PSH de type SPG15 qui est cliniquement très proche (Pensato et al., 2014). La reformation des lysosomes est perturbée par l'inhibition de l'expression de la protéine codée par le gène *SPG15*, la spatizine (Chang et al., 2014) et l'étude d'un modèle murin de cette pathologie a montré des similitudes avec les modèles murins SPG11. En effet, les souris *Spg15<sup>-/-</sup>* développent des troubles moteurs similaires, une perte neuronale dans le cortex et dans le cervelet et des accumulations de matériels autofluorescents dans les lysosomes (Khundadze et al., 2013). Il faut toutefois noter que l'analyse par microscopie électronique des lysosomes dans ce modèle montre des structures différentes de celles observées dans les modèles murins de la PSH de type SPG11 (Figure 55) (Branchu et al., 2017; Khundadze et al., 2013; Varga et al., 2015), de plus les structures multilamellaires observées dans des fibroblastes de patients SPG15 sont absentes dans les fibroblastes de patients atteints de la PSH de type SPG11 (Renvoisé et al., 2014). Ceci suggère que les molécules accumulées dans les lysosomes pourraient être, au moins en partie, différentes dans ces deux pathologies. Comme la perte de fonction de la spatascine entraîne au moins partiellement la perte de fonction de la spatizine (Branchu et al., 2017), on peut supposer que des anomalies ou accumulations ont lieu dans la PSH de type SPG15.

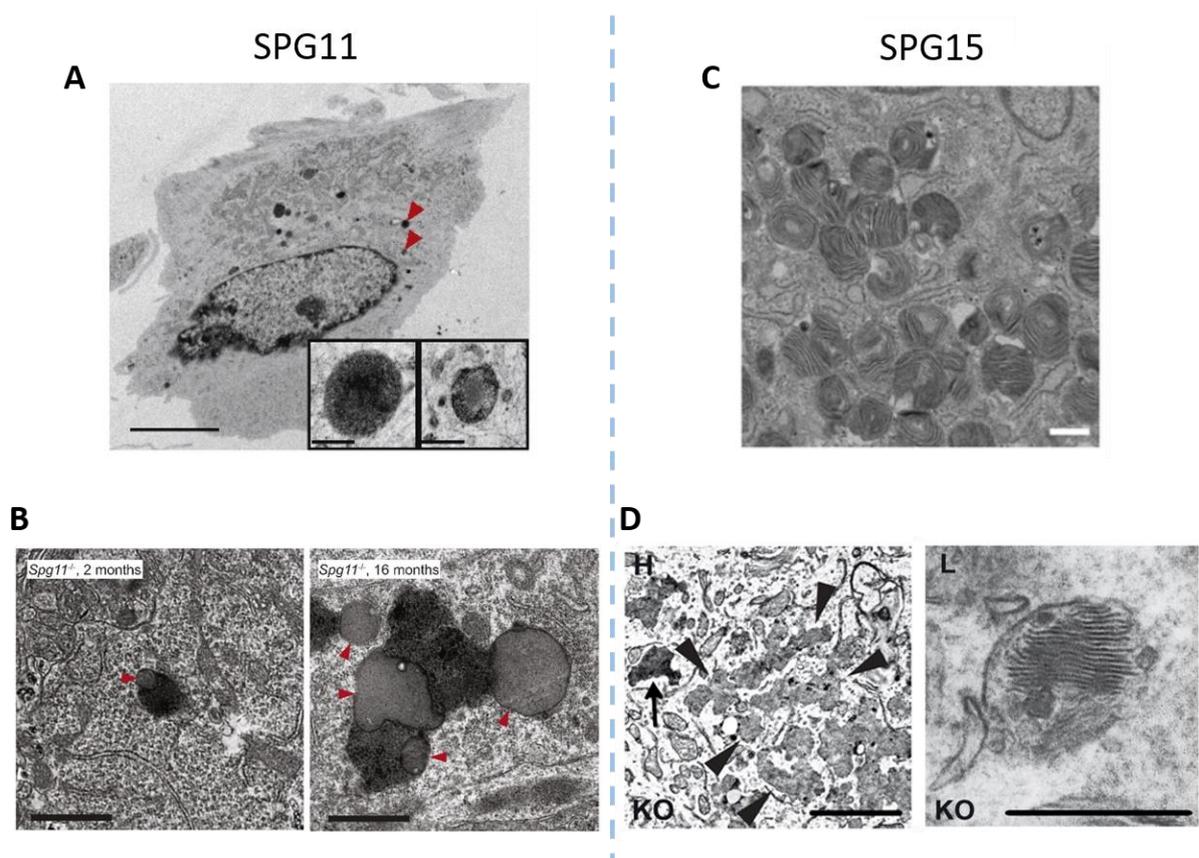


Figure 55 : Différences de structures lysosomales observées dans des fibroblastes murins embryonnaires *Spg11*<sup>-/-</sup> (A) et dans des fibroblastes de patients atteints par la PSH de type SPG15 (C) ; dans les neurones corticaux de souris *Spg11*<sup>-/-</sup> (B) et dans les neurones de Purkinje de souris *Spg15*<sup>-/-</sup> (D). Adapté de (Branchu et al., 2017; Khundadze et al., 2013; Renvoisé et al., 2014; Varga et al., 2015).

Des lysosomes avec une morphologie altérée et des accumulations de matériels ont été observés dans des modèles des PSH de types SPG4, SPG8 et SPG31 (Allison et al., 2017). Toutes ces données montrent que des dysfonctions des lysosomes sont impliquées dans un nombre important de PSH. Il serait intéressant de vérifier si ces accumulations sont composées de gangliosides et/ou de cholestérol pour mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques à l'origine de la neurodégénérescence des longs axones du faisceau corticospinal qui est touché dans ces maladies (Blackstone, 2012).

### III) Les mécanismes à l'origine de l'accumulation de lipides :

Nous avons montré que des accumulations de lipides, en particulier de gangliosides, dans les lysosomes perturbent leur recyclage et sensibilisent les neurones à la mort neuronale. Nos données suggèrent que ces résultats ne sont pas spécifiques de la spatacsine mais bien des accumulations de lipides dans les lysosomes. Les résultats que j'ai obtenus en utilisant les fibroblastes embryonnaires murins, montrent que l'export de lipides des lysosomes est diminué en absence de spatacsine et que des perturbations de l'homéostasie calcique participent aux dysfonctions des lysosomes.

#### 1) L'altération de l'efflux des lipides des lysosomes :

##### (a) L'export des lipides des lysosomes vers les gouttelettes lipidiques en conditions autophagiques :

Lorsque que nous avons remarqué que les lysosomes des cellules *Spg11*<sup>-/-</sup> contenaient plus de lipides que ceux des cellules sauvages nous avons évalué l'efflux des lipides des lysosomes vers d'autres organites. J'ai forcé l'activation de l'autophagie, par déprivation en nutriments, dans ces cellules. Il a été montré que pendant l'autophagie une accumulation transitoire de lipides a lieu dans les lysosomes et que ces lipides sont ensuite transférés vers d'autres organites et notamment les gouttelettes lipidiques (Rambold et al., 2015). Le transfert de lipides des lysosomes vers les gouttelettes lipidiques est diminué en absence de spatacsine et cela pourrait participer aux accumulations de lipides dans les lysosomes présentes observées en conditions basales. Un problème d'efflux, avec le temps, pourrait conduire aux accumulations lipidiques observées dans les modèles de la PSH de type SPG11 (Branchu et al., 2017; Varga et al., 2015). Cette expérience n'a pas pu être reproduite dans les neurones en culture puisque la privation en nutriments n'induit pas l'autophagie dans nos conditions, comme observé par d'autres groupes (Mizushima et al., 2004). La présence d'accumulations de lipides dans les lysosomes des neurones *Spg11*<sup>-/-</sup> dans des conditions basales suggère que l'export des lipides est aussi altéré dans ces cellules. La spatacsine pourrait donc être impliquée dans le transport de lipides des lysosomes vers d'autres compartiments et par exemple avoir un rôle inverse de protéines comme STARD3 qui transfèrent le cholestérol du RE vers les endosomes (Wilhelm et al., 2017).

Le nombre de gouttelettes lipidiques est diminué dans les cellules *Spg11*<sup>-/-</sup> ce qui est cohérent avec une diminution de l'efflux des lipides des lysosomes. Il faut noter que des altérations de la taille ou du nombre de gouttelettes lipidiques ont été reportées dans plusieurs modèles de PSH (Falk et al., 2014; Klemm et al., 2013; Papadopoulos et al., 2015; Renvoisé et al., 2012). Des altérations du métabolisme des lipides, et en particulier des gouttelettes lipidiques sont donc impliquées dans la

physiopathologie des PSH mais dans plusieurs de ces cas l'efflux de lipides des lysosomes vers les gouttelettes lipidiques ne semble pas être diminué. En effet, c'est une augmentation de la taille ou du nombre des gouttelettes lipidiques qui est observée dans le cas de mutations perte de fonction des gènes codant pour la seipin (PSH de type SPG17) (Falk et al., 2014) ou la spartine (PSH de type SPG20) (Renvoisé et al., 2012). Des perturbations du métabolisme des lipides sont alors, comme des dysfonctions des lysosomes, en cause dans plusieurs PSH, ce qui suggère que ces mécanismes sont très importants pour la survie des neurones du faisceau pyramidal.

### **(b) L'efflux des gangliosides et du cholestérol :**

Les gangliosides doivent être réduits en unité simple (céramide, ose et acide sialique) qui sont exportées des lysosomes et sont réutilisées, notamment pour la synthèse de nouveaux gangliosides. L'efflux de ces sous unités pourrait être altéré en absence de spatacine mais les analyses lipidomiques réalisées sur des enrichissements en lysosomes de lysats de cerveaux de souris *Spg11*<sup>-/-</sup> n'indiquent aucune augmentation des niveaux de céramides dans les lysosomes. Les éléments dont nous disposons vont dans le sens d'un problème de dégradation des gangliosides simples qui conduit à leur accumulation.

Ces défauts de catabolisme des gangliosides pourraient résulter d'accumulation primaire de cholestérol dans la PSH de type SPG11. J'ai montré que l'export du cholestérol des lysosomes, provenant de l'endocytose du LDL, est fortement altéré dans les fibroblastes *Spg11*<sup>-/-</sup>. Ces résultats sont en accord avec le fait que le gène *SPG11* a été retrouvé impliqué dans le transfert du cholestérol des lysosomes vers la membrane plasmique (Figure 56) (Chu et al., 2015). Il pourrait se produire un phénomène similaire dans les neurones *Spg11*<sup>-/-</sup> même si ces derniers n'acquièrent pas de cholestérol via les LDL circulants qui ne passent pas la barrière hématoencéphalique (Zhang and Liu, 2015). Le cholestérol dans le cerveau est alors en grande partie issu de la biosynthèse, cette voie ne fait a priori pas intervenir de passage du cholestérol dans les lysosomes. Toutefois, du cholestérol est synthétisé par les astrocytes et relargué sous forme de lipoprotéines, qui sont ensuite captées par les neurones et dégradées dans les lysosomes pour libérer le cholestérol (Zhang and Liu, 2015). Cette voie cellulaire est similaire à l'endocytose de LDL et au catabolisme du cholestérol qui a lieu dans des cellules de types fibroblastes. Des accumulations de cholestérol sont d'ailleurs retrouvées dans les lysosomes des neurones dans la maladie de Niemann-Pick de type C (Sleat et al., 2004), ces accumulations sont la conséquences de la perte de fonction des protéines NPC1 ou NPC2 qui participent à l'export du cholestérol des lysosomes vers les autres organites (Infante et al., 2008). Les différentes données dont nous disposons indiquent que la PSH de type SPG11 possède certaines similitudes avec la maladie de Niemann-Pick de type C (perturbations de l'efflux

de cholestérol, accumulations de cholestérol et gangliosides dans les lysosomes, altérations de l'homéostasie calcique ou encore certains signes cliniques partagés). Il serait intéressant d'évaluer si des altérations de l'expression ou de la fonction de ces protéines dans les cellules *Spg11*<sup>-/-</sup> participent aux phénotypes observés. Nous ne pouvons pas exclure que la spatacsine pourrait aussi participer à une machinerie d'efflux de lipides et en particulier du cholestérol. En effet, la protéine pourrait être composée de domaines transmembranaires (Stevanin et al., 2007) et pourrait être localisée au niveau des lysosomes (Hirst et al., 2013).

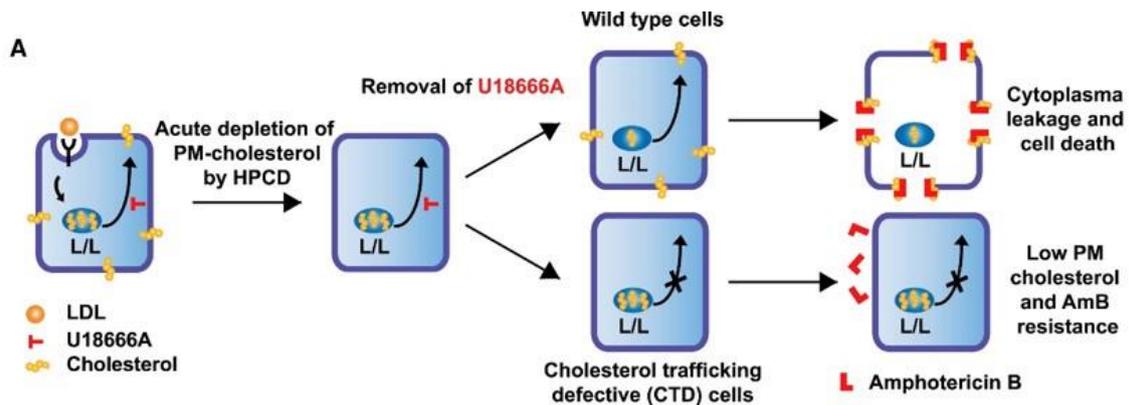


Figure 56 : Stratégie d'identification des protéines impliquées dans l'efflux du cholestérol utilisée par (Chu BB et al, 2015). Les auteurs de cette étude ont invalidé l'ensemble des gènes du génome par utilisation d'une banque d'ARN interférents. Le cholestérol de la membrane plasmique des cellules a été réduit (traitement à l'HPCD, une cyclodextrine) et des accumulations de cholestérol dans les lysosomes ont été induites (traitement au U18666a). Le U18666a a été enlevé du milieu, autorisant les cellules capables à exporter le cholestérol des lysosomes vers la membrane plasmique. Un traitement à l'amphotéricine B a été réalisé. Les cellules dans lesquelles le trafic du cholestérol des lysosomes vers la membrane plasmique est altéré survivent puisque l'amphotéricine B a besoin du cholestérol membranaire pour réaliser son action toxique. Les cellules ayant survécu ont été analysées pour déterminer quel gène avait été invalidé et ainsi identifier les gènes importants dans le processus du trafic du cholestérol des lysosomes vers la membrane plasmique (Chu et al., 2015).

## 2) Dérégulation de l'homéostasie calcique :

La présence plus importante, en taille et en nombre, de zones de contact entre le réticulum endoplasmique (RE) et la membrane plasmique dans les cellules *Spg11*<sup>-/-</sup> nous a amené à évaluer l'import de calcium extracellulaire par le « Store-Operated Calcium Entry » (SOCE). L'import de calcium par ce processus est augmenté en absence de spatacsine et induit une augmentation de la concentration en calcium dans le cytosol. Les niveaux de calcium dans les lysosomes sont aussi augmentés et la libération de calcium par les lysosomes est diminuée.

## (a) Impact de ces dérégulations sur les dysfonctions des lysosomes :

### (i) L'augmentation de l'import de $\text{Ca}^{2+}$ par le SOCE :

J'ai montré que réduire l'import de calcium par le SOCE permet de diminuer les accumulations de lipides dans les lysosomes et de rétablir le recyclage des lysosomes. Ces résultats suggèrent que la perturbation de l'homéostasie calcique participe aux dysfonctions des lysosomes dans la PSH de type SPG11. L'augmentation des accumulations de lipides dans les lysosomes par le SOCE pourrait intervenir de plusieurs manières.

Premièrement, le SOCE participe à des voies de signalisation cellulaire et l'augmentation du SOCE pourrait perturber l'une d'entre elles. Récemment il a été montré que le SOCE est impliqué dans le métabolisme des lipides (Maus et al., 2017). Cette étude montre que le SOCE participe à des voies de dégradation de lipides en induisant notamment la transcription de gènes codant pour des lipases et des protéines du métabolisme des acides gras. Les cellules incapables d'importer du calcium par le SOCE ont un nombre de gouttelettes lipidiques qui est augmenté en réponse à une augmentation de la lipophagie (Maus et al., 2017). Il serait alors intéressant de vérifier si l'augmentation du SOCE dans les cellules *Spg11<sup>-/-</sup>* a des conséquences sur la lipophagie et la lipolyse. De telles conséquences pourraient participer aux problèmes d'accumulation de lipides et de diminution du nombre de gouttelettes lipidiques.

Deuxièmement, l'augmentation d'import de calcium entraîne une augmentation légère de la concentration en calcium dans le cytosol des cellules *Spg11<sup>-/-</sup>*. Etant donné que le calcium est impliqué dans un très grand nombre de fonctions cellulaires (Clapham, 2007), il est possible qu'une légère augmentation des taux de calcium cytosolique perturbe des voies cellulaires dont des fonctions lysosomales. Enfin, l'augmentation de calcium dans le cytosol pourrait être compensée par les lysosomes qui joueraient un rôle tampon en réduisant les niveaux de calcium dans le cytosol. Un tel rôle pourrait conduire à l'augmentation des taux de  $\text{Ca}^{2+}$  dans les lysosomes des cellules *Spg11<sup>-/-</sup>*. Des expériences complémentaires sont nécessaires pour déterminer si l'augmentation de calcium dans les lysosomes provient d'un rôle tampon. Toutefois, si les lysosomes sont capables de capter du calcium en provenance du RE (Garrity et al., 2016; López-Sanjurjo et al., 2013) il n'est pas établi que ces organites soient capables de capter du calcium du cytosol et l'identité de la (ou des) pompe(s) qui importe(nt) le calcium dans les lysosomes est toujours inconnue(s) (Feng and Yang, 2016)

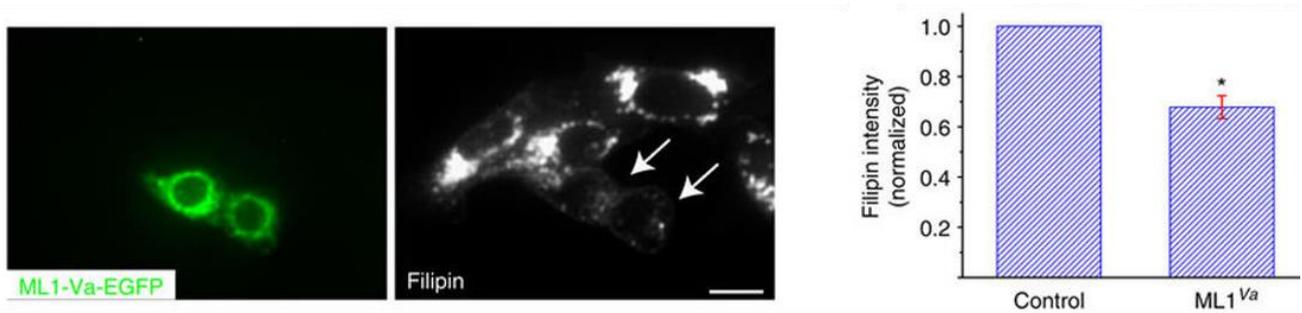
## (ii) Le calcium des lysosomes :

Les niveaux de calcium sont augmentés dans les lysosomes tandis que la libération de calcium par le canal TRPML1 est diminuée en absence de spatacsine. Il est possible que la diminution de libération de  $\text{Ca}^{2+}$  par TRPML1 participe à l'augmentation du calcium dans les lysosomes mais je n'ai pas été en mesure de vérifier cette hypothèse. L'augmentation du calcium dans les lysosomes pourrait perturber la fonction de protéines participant à l'efflux des lipides ou encore à la dégradation des gangliosides. Toutefois, le pH des lysosomes et l'activité de la cathepsine B ne sont pas modifiés (Figure 29) ce qui suggère que l'augmentation des niveaux de calcium n'induit pas une perturbation globale de l'activité catalytique des lysosomes en absence de spatacsine. Les niveaux de calcium des lysosomes sont altérés dans plusieurs maladies de surcharges des lysosomes (Lloyd-Evans and Platt, 2011). Ces défauts sont en général secondaires à l'accumulation de lipides.

Par exemple dans la maladie de Niemann-Pick de type C, c'est l'accumulation de sphingosine dans les lysosomes qui provoquerait une diminution des niveaux de calcium dans ces organites (Lloyd-Evans et al., 2008). L'accumulation de sphingosine perturberait l'absorption de calcium par les lysosomes. Comme j'ai observé une augmentation des niveaux de calcium dans les lysosomes il est peu probable qu'un tel mécanisme soit à l'œuvre dans les cellules *Spg11<sup>-/-</sup>*. La mucopolidose de type IV est causée par la perte de fonction de TRPML1, un canal calcique lysosomal (Feng and Yang, 2016; Micsenyi et al., 2009). Toutefois, il semblerait que la perte de fonction de TRPML1 ne change pas les niveaux de calcium des lysosomes dans les cellules (Lloyd-Evans and Platt, 2011). Cela signifierait que les augmentations de calcium des lysosomes pourraient ne pas être la conséquence de la diminution de la libération de calcium par TRPML1 dans les cellules en absence de spatacsine. L'inhibition de TRPML1 par des agents pharmacologiques ou via la diminution de son expression par ARN interférent dans les cellules sauvages, permettrait de déterminer les conséquences de la diminution de la libération de calcium par TRPML1.

En absence de spatacsine, la diminution de la libération de calcium par TRPML1 semble être secondaire à des accumulations de lipides dans les lysosomes. Il a été montré que des accumulations primaires de lipides peuvent affecter l'activité de TRPML1 ce qui conduit à l'accumulation secondaire d'autres lipides (Shen et al., 2012). Cela a été montré dans des modèles cellulaires de la maladie de Niemann-Pick de type C et de manière intéressante augmenter l'expression ou l'activité de TRPML1 dans ces cellules réduit les accumulations de lipides dans les lysosomes (Figure 57) (Shen et al., 2012). J'ai obtenu des résultats similaires en stimulant TRPML1 par l'agoniste ML-SA1 dans les cellules *Spg11<sup>-/-</sup>*. Ainsi, des accumulations primaires inhiberaient TRPML1 ce qui induirait des accumulations secondaires qui amplifieraient le processus d'accumulation de lipides. Rétablir

la fonction de TRPML1 permettrait de mettre fin à ce cercle vicieux. De la même manière, des accumulations de cholestérol dans les cellules du cerveau d'un modèle murin de la mucopolipidose de type IV (causée par la perte de fonction de TRPML1) ont été décrites mais en quantité beaucoup moins importante que dans des modèles de la maladie de Niemann-Pick de type C (Micsenyi et al., 2009). Ces résultats ont aussi été obtenus dans divers modèles cellulaires (Li et al., 2016; Soyombo et al., 2006), mais pas par toutes les équipes (Pryor et al., 2006).



**Figure 57 :** Les cellules CHO *NPC1*<sup>-/-</sup> exprimant une forme constitutivement active du canal TRPML1 (ML1-Va-EGFP) ont une réduction des accumulations de cholestérol (marqué par la Filipin) (Shen et al., 2012).

La diminution de libération de calcium par TRPML1 dans les cellules *Spg11*<sup>-/-</sup> pourrait altérer certaines voies de signalisation dans lesquelles est impliqué TRPML1. Il a été montré que TRPML1, dans des conditions de stress (manque de nutriments, exercice physique, etc.) participe à l'activation du facteur de transcription TFEB qui est impliqué dans l'activation d'un grand nombre de gènes participant à des fonctions lysosomales et autophagiques (Medina et al., 2015). L'activation de la transcription de gènes par TFEB est notamment impliquée dans la biogénèse des lysosomes (Di Paola et al., 2017). Il serait intéressant de vérifier les niveaux d'expression et de phosphorylation (témoignant d'un état inactif) de TFEB dans les cellules *Spg11*<sup>-/-</sup>. Une activation insuffisante de TFEB pourrait ainsi participer aux dysfonctions lysosomales dans la PSH de type SPG11.

## (b) Les origines possibles des dérégulations de l'homéostasie calcique :

### (i) Le SOCE :

L'augmentation de l'import de Ca<sup>2+</sup> par le SOCE en absence de spatacine pourrait avoir plusieurs origines. J'ai montré que la dissociation des oligomères de STIM1, nécessaire à l'arrêt de l'import de calcium, est perturbée dans les fibroblastes *Spg11*<sup>-/-</sup>. Récemment deux études indépendantes ont proposé que le cholestérol participe à l'inhibition du SOCE. Le canal Orai1 a un domaine de liaison au cholestérol et cette interaction limite l'activité du canal et donc l'entrée de calcium (Derler et al., 2016). STIM1 possède aussi un domaine de liaison au cholestérol et cette interaction participe à l'inhibition de l'interaction de STIM1 avec Orai1. (Pacheco et al., 2016). Ces données suggèrent que la diminution des niveaux de cholestérol à la membrane plasmique dans les cellules *Spg11*<sup>-/-</sup>

pourrait participer à l'augmentation de l'import de  $\text{Ca}^{2+}$  par le SOCE. Augmenter artificiellement les niveaux de cholestérol à la membrane plasmique par l'utilisation de Methyl- $\beta$ -cyclodextrine et observer les conséquences sur l'import de calcium en absence de spatacsine pourraient permettre de vérifier cette hypothèse. Toutefois, le rôle exact du cholestérol à la membrane plasmique pourrait être plus complexe. En effet, diminuer artificiellement le cholestérol de la membrane plasmique semble empêcher l'association de STIM1 et d'Orai1 entraînant une diminution de l'import de calcium par le SOCE (Galan et al., 2010; Gwozdz et al., 2012). De plus, la diminution des niveaux de cholestérol à la membrane plasmique pourrait conduire à une internalisation plus importante d'Orai1 ce qui modulerait le SOCE (Bohórquez-Hernández et al., 2017). L'impact de la diminution chronique du cholestérol à la membrane plasmique, en absence de spatacsine, est encore à explorer mais nous pourrions être en présence d'un cercle vicieux qui s'entretient.

Le SOCE est mis en place au niveau de zones de contact entre le réticulum endoplasmique (RE) et la membrane plasmique. Une altération de la régulation de ces zones de contact pourrait conduire à l'augmentation d'import de calcium observée dans les cellules *Spg11*<sup>-/-</sup>. Ces défauts pourraient avoir plusieurs origines. Le réseau de RE tubulaire et sa régulation pourraient être altéré en absence de spatacsine et conduire à une mauvaise dissociation des zones de contact entre le RE et la membrane plasmique. Il a récemment été montré que la perte de fonction de l'atlastine 1 (codée par un gène muté dans la PSH de type SPG3) induit une diminution de l'import de calcium en réponse à un changement de la morphologie du réseau de RE qui diminue les contacts avec la membrane plasmique (Li et al., 2017a). La perte de fonction de la spatacsine pourrait conduire au mécanisme inverse, en stabilisant les contacts entre le RE et la membrane plasmique. Une altération de la morphologie du RE est, par ailleurs, impliquée dans un nombre important de PSH (Blackstone, 2012).

Enfin, la dissociation des oligomères STIM1 et des contacts entre STIM1 et Orai1 fait intervenir plusieurs protéines. Par exemple, la protéine SARAF (SOCE-associated regulatory factor) joue un rôle important dans en inhibant l'import trop important de calcium par le SOCE (Figure 58) (Albarran et al., 2016; Palty et al., 2012). La perte de fonction de la spatacsine pourrait perturber l'expression, la localisation ou la fonction de protéines impliquées dans l'inhibition du SOCE. Ces paramètres devront être évalués dans les cellules *Spg11*<sup>-/-</sup>.

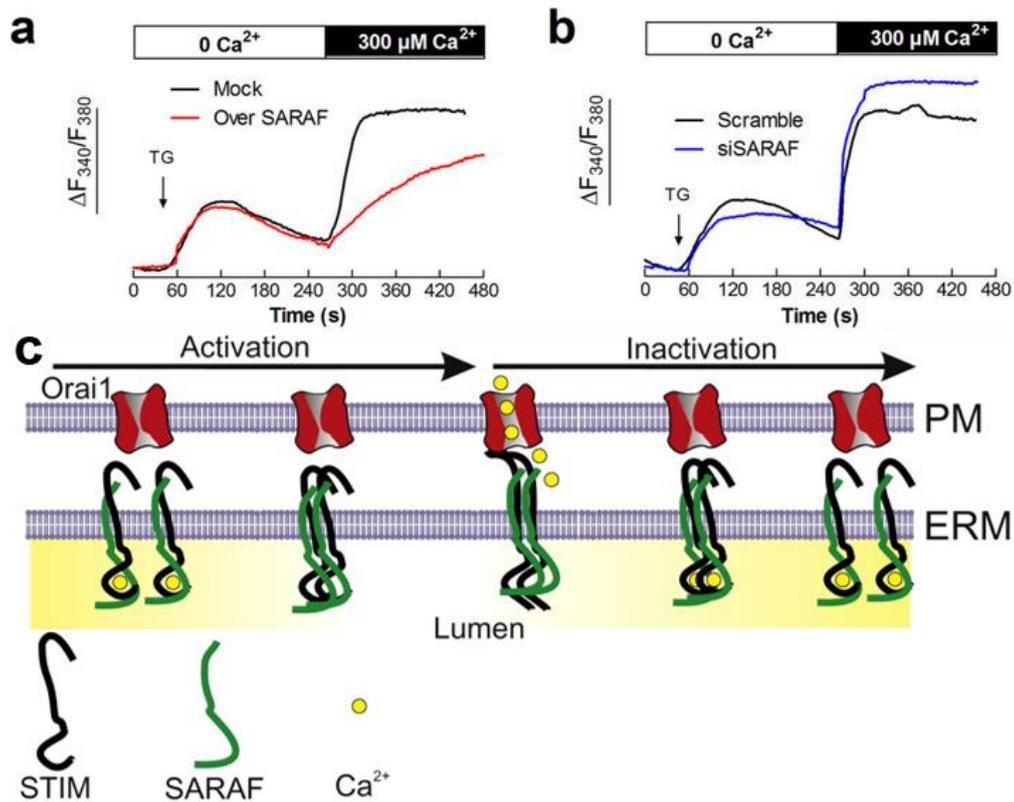


Figure 58 : Rôle de SARAF dans l'inhibition de l'import de  $\text{Ca}^{2+}$  par le SOCE. (A) La surexpression de SARAF (Over SARAF) induit une diminution de l'import de calcium par le SOCE. (B) l'effet inverse est obtenu par une diminution de l'expression de SARAF (siSARAF) (Albarran et al., 2016). (C) Représentation schématique du rôle de SARAF dans l'inactivation du SOCE (Palty et al., 2012).

(ii) Le calcium des lysosomes :

La diminution de la libération de calcium par TRPML1 pourrait aussi contribuer à l'augmentation du calcium dans les lysosomes. L'agoniste naturel du canal TRPML1 est le  $\text{PI}(3,5)\text{P}_2$  (Dong et al., 2010). Un problème de synthèse ou une mauvaise localisation de ce phosphoinositide expliquerait la diminution de l'activité de TRPML1. La localisation du  $\text{PI}(3,5)\text{P}_2$  peut être observée à l'aide de l'expression de domaines protéique capable de le lier et couplés à un fluorochrome (Figure 59) (Li et al., 2013). La réalisation de cette expérience dans les fibroblastes permettrait de déterminer si la diminution de libération de calcium par TRPML1 provient d'une activation réduite par le  $\text{PI}(3,5)\text{P}_2$ .

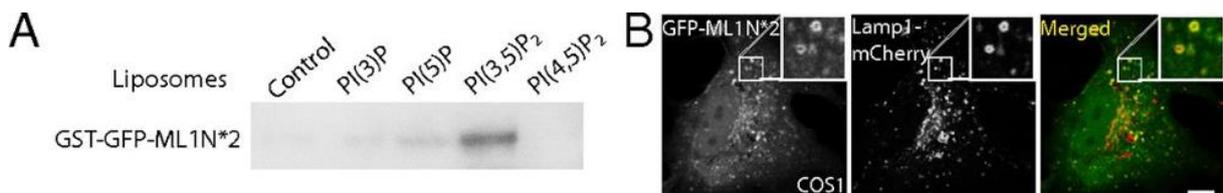


Figure 59 : La construction GST-GFP-ML1n\*2 est capable de lier le  $\text{PI}(3,5)\text{P}_2$  (A) et colocalise avec le marqueur des endosomes tardifs et lysosomes Lamp1 (B) (Li et al., 2013).

Enfin, les dérégulations de l'homéostasie calcique en absence de spatacsine pourraient signifier que la protéine a un rôle direct dans un ou plusieurs de ces mécanismes cellulaires. Les fonctions possibles de la spatacsine dans ces voies cellulaires sont présentées dans la partie suivante de la discussion.

### 3) La spatacsine :

La ou les fonctions de la spatacsine restent, à ce jour, inconnues même si des hypothèses sur les voies dans lesquelles elle intervient ont été émises. Il a été proposé que la spatacsine joue un rôle dans le trafic intracellulaire (Hirst et al., 2013; Pérez-Brangulí et al., 2014) ou encore dans la fonction des lysosomes (Renvoisé et al., 2014) et en particulier dans leur recyclage (Chang et al., 2014).

Les résultats que j'ai obtenus au cours de mon travail de thèse n'ont pas permis de découvrir les rôles précis de la spatacsine. En effet, nous nous sommes concentrés sur les conséquences de la perte de fonction de la protéine. Nos données suggèrent que la spatacsine pourrait avoir un rôle dans la régulation de l'import de calcium extracellulaire par le SOCE. A la lumière de certaines expériences nous pouvons toutefois appréhender un peu mieux les rôles de la protéine.

La localisation de la spatacsine est débattue. Elle a été retrouvée à différents compartiments cellulaires tels que le cytoplasme, le réticulum endoplasmique, le cytosquelette, ou encore les lysosomes (Chang et al., 2014; Hirst et al., 2013; Murmu et al., 2011). Nous ne disposons pas d'anticorps capables de reconnaître efficacement la spatacsine endogène dans les cellules. Pour étudier la localisation de la protéine j'ai exprimé une spatacsine couplée à un tag V5 dans des fibroblastes et des neurones en culture. La protéine est cytoplasmique et ne semble pas être localisée dans un organelle précis (données non présentées). Des co-marquages avec des marqueurs de différents organites montrent une colocalisation très faible, mais il apparaît clairement que la spatacsine n'est pas majoritairement localisée au niveau des lysosomes dans nos conditions. La spatacsine ne semble donc pas être une protéine uniquement lysosomale comme cela avait été proposé (Chang et al., 2014; Hirst et al., 2013). Le fait que les problèmes de recyclage des lysosomes puissent être diminués en réduisant les accumulations de lipides dans les lysosomes suggère aussi que la protéine n'est pas requise pour la reformation des lysosomes. Nous ne pouvons cependant pas exclure que la protéine joue un rôle au niveau de ces organites ou qu'elle s'y localise dans certaines conditions.

Une fonction de la spatacsine dans le recyclage des lysosomes ne peut pas être exclue mais nos données suggèrent que l'altération de la reformation de ces organites est perturbée par des accumulations de lipides dans les lysosomes des cellules *Spg11<sup>-/-</sup>*. Si la spatacsine a bien un rôle dans

cette fonction il semblerait que sa présence ne soit pas absolument requise pour le processus. Il sera nécessaire d'étudier plus en détails les possibles fonctions de la spatacsine au niveau du système lysosomal.

La protéine de fusion spatacsine-V5 est localisée dans l'ensemble du cytoplasme des cellules et elle est enrichie au niveau sous cortical, ce qui pourrait être cohérent avec un rôle dans la régulation des zones de contact entre le réticulum et la membrane plasmique. La protéine colocalise aussi partiellement avec le réticulum endoplasmique (marqué par Reep5). L'augmentation du nombre et de la taille des zones de contact entre le RE et la membrane plasmique, qui est à confirmer dans les fibroblastes, pourrait provenir d'un tel rôle. De manière similaire, cette localisation cellulaire pourrait indiquer un rôle dans la régulation du SOCE et expliquer l'augmentation de l'import de calcium par ce phénomène. Des expériences complémentaires devront être réalisées pour établir la localisation précise de la protéine ainsi que ses fonctions moléculaires.

## Conclusion générale :

Ainsi, mes travaux de thèse ont permis de mettre en évidence que la perte de fonction de la spatacsine provoque l'accumulation, notamment de gangliosides simples (GM2, GM3, GD2 et GD3) et de cholestérol dans le système lysosomal. Ces altérations du métabolisme des lipides sont en partie la conséquence de la dérégulation de l'import de calcium par le mécanisme du SOCE. Les niveaux trop élevés de gangliosides, mais aussi de cholestérol dans les autolysosomes perturbent la reformation des lysosomes à partir de ces organites. Des accumulations de gangliosides et de cholestérol sont présentes dans un grand nombre de pathologies ce qui suggère que des problèmes de reformation de lysosomes pourraient être impliqués dans la physiopathologie de nombreuses maladies et notamment des maladies neurodégénératives. La réduction des accumulations de gangliosides dans les lysosomes diminue la sensibilité des neurones à la mort induite par le glutamate. L'inhibition de la synthèse des gangliosides pourrait ainsi représenter une approche thérapeutique dans la PSH de type SPG11. Ces données illustrent l'implication de dysfonctions des lysosomes dans des pathologies du système nerveux et soulignent l'importance de ces organites pour la survie des neurones. L'ensemble des données obtenues sont résumées dans le schéma ci-dessous (Figure 60).

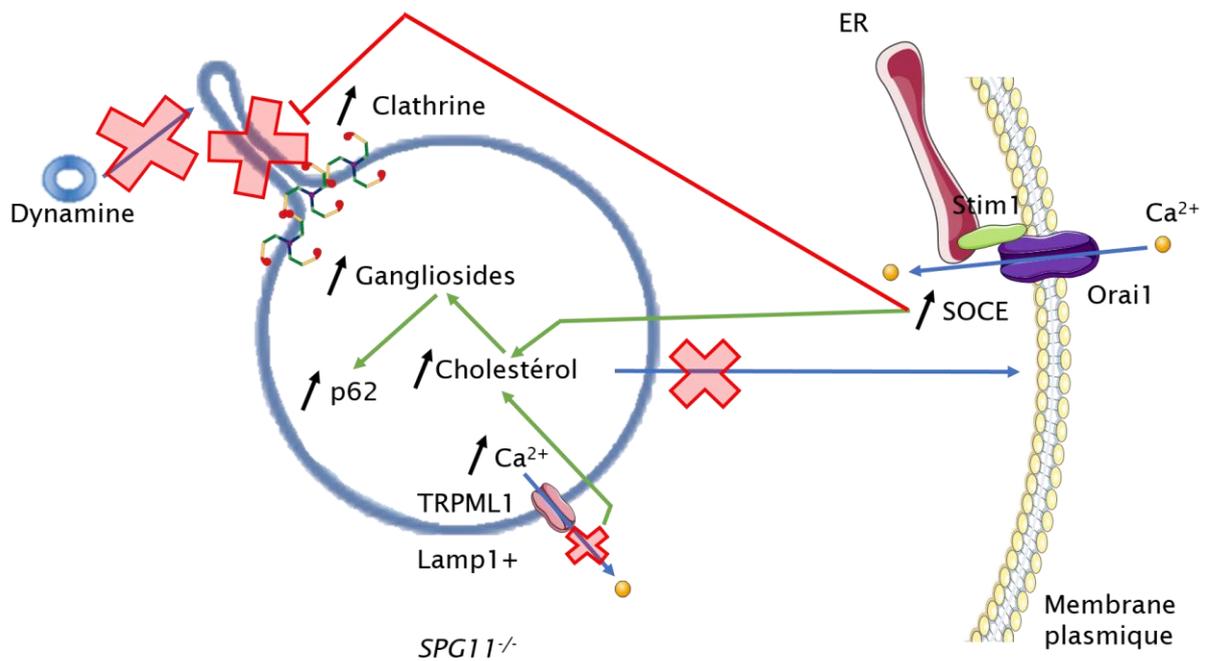


Figure 60 : Représentation des phénotypes cellulaires observés dans les cellules *Spg11*<sup>-/-</sup>. En absence de spatacsine le recyclage des lysosomes (ALR) est perturbé. Une accumulation de gangliosides simples se produit dans ces organites. La clathrine est enrichie au niveau des lysosomes dans lesquels se produisent ces accumulations et le recrutement de la dynamine, qui est impliquée dans l'étape finale de l'ALR, est perturbé. La perte de fonction de la spatacsine altère aussi la régulation de l'import de Ca<sup>2+</sup> extracellulaire par le SOCE ce qui induit une entrée de calcium plus importante. Cette augmentation est responsable d'une élévation de la concentration en Ca<sup>2+</sup> dans le cytosol (non représentée sur ce schéma). De manière similaire les taux de calcium sont augmentés dans les lysosomes et la libération de Ca<sup>2+</sup> par le canal TRPML1 est diminuée. L'augmentation du SOCE et la diminution de libération de Ca<sup>2+</sup> par TRPML1 participent à l'accumulation de cholestérol dans les lysosomes. L'efflux du cholestérol des lysosomes vers les autres organites est lui aussi réduit. J'ai pu obtenir des résultats préliminaires, suggérant que les accumulations de cholestérol participeraient aux accumulations de gangliosides. Enfin, les accumulations de gangliosides induisent une accumulation d'autolysosomes dans les cellules et participent à la mort neuronale *in vitro*.

## Perspectives :

### I) Inhibition de la synthèse des gangliosides et stratégie thérapeutiques :

Dans le futur, nous allons nous attacher à tester l'efficacité d'un traitement inhibiteur de la synthèse des gangliosides dans un modèle *in vivo* de la pathologie. Pour cela deux stratégies s'offrent à nous : une inhibition pharmacologique par une molécule comme le miglustat, ou une diminution d'expression d'une enzyme clef de cette voie de synthèse, la GM3 synthase par exemple. Il sera nécessaire d'évaluer si ces traitements sont capables de réduire les accumulations de gangliosides dans le système lysosomal et si des améliorations de paramètres cliniques sont observées. Ces deux stratégies seront testées dans des modèles différents. L'inhibition pharmacologique de la synthèse des gangliosides sera effectuée dans un modèle de poisson zèbre de la PSH de type SPG11. Un tel modèle a déjà été étudié au laboratoire et a fait l'objet d'une publication : l'inhibition de l'expression de la spatacsine, par l'utilisation de morpholinos, induit l'apparition d'un phénotype moteur chez le poisson zèbre (Martin et al., 2012). Nous vérifierons, dans un premier temps, que les larves de poissons zèbres traitées par des morpholinos dirigés contre le gène *spg11* présentent des accumulations de gangliosides dans le système nerveux central. Des traitements au miglustat seront alors effectués et leur efficacité à diminuer les accumulations de gangliosides sera évaluée. La barrière hémato-encéphalique n'est pas encore en place dans les larves de poissons zèbres au stade 48-72 heures post-fertilisation ce qui permet à la molécule d'agir au niveau du système nerveux central. Nous réaliserons le test de la réponse de fuite pour évaluer les capacités motrices des poissons traités ou non par le miglustat et déterminer si l'inhibition de la synthèse des gangliosides est une stratégie efficace pour réduire les phénotypes moteurs. La deuxième stratégie consiste en l'inhibition de l'expression de la GM3 synthase sera effectuée dans le modèle murin de la PSH de type SPG11 développé par l'équipe. L'inhibition sera réalisée par utilisation de lentivirus contenant la séquence du miRNA dirigée contre la GM3 synthase précédemment utilisée dans l'étude. Les traitements par les lentivirus seront effectués à des âges précoces, de 6 et 8 semaines, et ne cibleront que l'expression de la protéine dans les neurones. Cette stratégie présente plusieurs avantages par rapport au traitement pharmacologique au miglustat. En effet, cela permet de s'affranchir de certains effets secondaires du médicament en ne ciblant que les neurones, le miglustat étant connu pour provoquer des complications digestives par exemple (Lyseng-Williamson, 2014). L'inhibition de l'enzyme sera stable dans le temps et seulement la synthèse des gangliosides sera inhibée, contrairement au miglustat qui inhibe des voies de synthèse plus générale. La présence d'effets secondaires induits par les traitements sera aussi importante à étudier, des altérations de la synthèse

des gangliosides étant impliquées dans des maladies y compris des PSH (PSH de type SPG26) (Boukhris et al., 2013).

La PSH de type SPG11 est très proche, d'un point de vue clinique, de la forme SPG15 (Hanein et al., 2008; Pensato et al., 2014) et la spatacsine interagit avec des produits de gènes impliqués dans des PSH comme la spastizine (SPG15) ou AP5Z1 (SPG48) (Slabicki, et al., 2010, Hirst et al., 2013). Il sera alors intéressant de tester si des accumulations de gangliosides et de cholestérol sont présentes dans des modèles de ces pathologies. Des fibroblastes de patients, disponibles au laboratoire, seront utilisés pour faire ces expériences. Si cela est possible, il serait aussi intéressant de tester cela sur des cerveaux de patients. Ces expériences permettront de démontrer si les gangliosides sont aussi impliqués dans ces pathologies. L'inhibition thérapeutique des gangliosides pourrait alors représenter une stratégie pour le traitement de ces pathologies.

## **II) Exploration des fonctions moléculaires de la spatacsine :**

Les fonctions moléculaires de la spatacsine devront être explorées. Nous avons identifié une liste de partenaires potentiels de la partie C-terminale de la spatacsine par la réalisation d'un crible double hybride chez la levure. L'analyse de ces interacteurs potentiels pourrait permettre d'identifier des voies cellulaires dans lesquelles la spatacsine joue un rôle. La présence d'interacteurs potentiels impliqués dans les voies de reformation des lysosomes, le métabolisme des lipides ou dans la régulation de l'homéostasie calcique pourrait permettre de comprendre plus précisément les rôles de la protéine dans ces voies cellulaires. Les interacteurs potentiels les plus pertinents, sur la base de leurs fonctions connues, seront étudiés et l'interaction avec la spatacsine sera confirmée par des techniques de co-immunoprécipitation. Par exemple, l'un des interacteurs potentiel les plus intéressants qui a été mis en évidence par ce crible double hybride est la dynamine 1. Cette protéine est impliquée dans la déformation et la scission de membranes. La dynamine participe ainsi au processus de reformation des lysosomes et semble intervenir à l'étape de scission des tubules et vésicules émanant des autolysosomes (Schulze et al., 2013). Si cette interaction est confirmée cela pourrait signifier que la spatacsine a effectivement un rôle moléculaire dans la reformation des lysosomes et qu'elle pourrait être nécessaire au recrutement de la dynamine au niveau des lysosomes. Je validerai cette interaction en réalisant des co-immunoprécipitations dans des cellules transfectées exprimant la spatacsine couplée à l'étiquette V5. Si l'interaction existe, des expériences complémentaires seront effectuées pour comprendre les fonctions de cette interaction et les conséquences de l'absence de spatacsine sur la fonction de la dynamine 1.

De plus, nous disposons d'un modèle murin qui exprime une spatacsine tronquée de la partie codée par les exons 32 à 34. Même si le phénotype apparaît plus tardivement, ce modèle présente des troubles cognitifs et moteurs ainsi que des accumulations de gangliosides. Le domaine codé par les exons 32 à 34 est donc essentiel pour la fonction de la spatacsine. En étudiant les altérations cellulaires causées par l'absence de ce domaine nous serons peut-être en mesure de mettre en évidence la présence d'un domaine fonctionnel de la protéine ou de comprendre plus précisément les rôles de la protéine complète. Ainsi, la reformation des lysosomes et les accumulations de gangliosides et de cholestérol en leur sein seront explorées. L'homéostasie calcique sera, elle aussi, étudiée, en particulier l'import de calcium par le SOCE et le contenu en calcium des lysosomes. Nous espérons ainsi mieux comprendre les fonctions de la protéine et les mécanismes physiopathologiques à l'origine de la PSH de type SPG11. Un second crible double hybride sera réalisé sur la partie C-terminale de la spatacsine, tronquée des exons 32 à 34, cette fois-ci. Nous disposerons alors des interacteurs potentiels de cette forme tronquée de la spatacsine et observerons si certains d'entre eux sont spécifiques de la spatacsine possédant les exons 32 à 34 puisque nous disposons dès à présent de la liste d'interacteurs potentiels de la forme complète de la partie C-terminale de la protéine. L'étude de cette forme tronquée de la protéine représente ainsi une occasion intéressante d'étudier les fonctions de la spatacsine complète et permettra peut-être de comprendre, par exemple, les liens existants entre les dysfonctions lysosomales et l'altération de l'homéostasie calcique ainsi que les conséquences physiopathologiques de ces altérations.

## **II) Lien entre la perte de fonction de la spatacsine et la dérégulation de l'homéostasie calcique :**

Enfin, je chercherai aussi à établir comment la perte de fonction de la spatacsine conduit à l'augmentation de l'import de  $Ca^{2+}$  extracellulaire. La perturbation de l'import de calcium par le SOCE pourrait provenir d'une altération de la dynamique des contacts entre le réticulum endoplasmique et la membrane plasmique. Là aussi, l'étude de la liste des interacteurs potentiels de la spatacsine obtenue par le crible double hybride sera primordiale. Si la spatacsine interagit effectivement avec la dynamine, cela pourrait signifier que la spatacsine joue un rôle dans des processus d'endocytose et participe ainsi au recyclage des canaux Orai1. L'internalisation du canal Orai1 peut être utilisée par les cellules pour inhiber l'entrée de calcium par le SOCE. Cette internalisation pourrait ainsi être altérée par la perte de fonction de la spatacsine. L'endocytose du canal sera alors étudiée après différents temps d'import de calcium extracellulaire par le SOCE. De plus, il a été montré que le cholestérol de la membrane plasmique a un effet inhibiteur sur Orai1 et STIM1, et donc sur le SOCE (Derler et al., 2016 ; Pacheco et al., 2016). Il sera possible de moduler les niveaux de cholestérol à la membrane plasmique en utilisant la Methyl- $\beta$ -cyclodextrine (Derler

et al., 2016). L'augmentation des niveaux de cholestérol dans la membrane plasmique des cellules mutantes par ce moyen et la mesure de l'import de calcium par le SOCE pourrait permettre de déterminer si les diminutions de cholestérol à la membrane plasmique participent à l'augmentation de l'import de calcium par le SOCE.

Ces différentes expériences nous permettront de comprendre le rôle de la spatacsine dans la régulation de l'entrée de calcium extracellulaire par le SOCE et les liens entre ces dysfonctions et la perturbation du métabolisme des lipides.

## Bibliographie :

- Alazami, A.M., Adly, N., Al Dhalaan, H., and Alkuraya, F.S. (2011). A nullimorphic ERLIN2 mutation defines a complicated hereditary spastic paraplegia locus (SPG18). *Neurogenetics* *12*, 333–336.
- Albarran, L., Lopez, J.J., Amor, N.B., Martin-Cano, F.E., Berna-Erro, A., Smani, T., Salido, G.M., and Rosado, J.A. (2016). Dynamic interaction of SARAF with STIM1 and Orai1 to modulate store-operated calcium entry. *Sci. Rep.* *6*, 24452.
- Allison, R., Edgar, J.R., Pearson, G., Rizo, T., Newton, T., Günther, S., Berner, F., Hague, J., Connell, J.W., Winkler, J., et al. (2017). Defects in ER-endosome contacts impact lysosome function in hereditary spastic paraplegia. *J. Cell Biol.* *216*, 1337–1355.
- Anderson, R.G., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (1977). Role of the coated endocytic vesicle in the uptake of receptor-bound low density lipoprotein in human fibroblasts. *Cell* *10*, 351–364.
- Anheuser, S., Breiden, B., Schwarzmann, G., and Sandhoff, K. (2015). Membrane lipids regulate ganglioside GM2 catabolism and GM2 activator protein activity. *J. Lipid Res.* *56*, 1747–1761.
- Arantes, R.M.E., and Andrews, N.W. (2006). A role for synaptotagmin VII-regulated exocytosis of lysosomes in neurite outgrowth from primary sympathetic neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *26*, 4630–4637.
- Arthur, J.R., Wilson, M.W., Larsen, S.D., Rockwell, H.E., Shayman, J.A., and Seyfried, T.N. (2013). Ethylenedioxy-PIP2 oxalate reduces ganglioside storage in juvenile Sandhoff disease mice. *Neurochem. Res.* *38*, 866–875.
- Ashe, K.M., Bangari, D., Li, L., Cabrera-Salazar, M.A., Bercury, S.D., Nietupski, J.B., Cooper, C.G.F., Aerts, J.M.F.G., Lee, E.R., Copeland, D.P., et al. (2011). Iminosugar-based inhibitors of glucosylceramide synthase increase brain glycosphingolipids and survival in a mouse model of Sandhoff disease. *PLoS One* *6*, e21758.
- Bach, G. (2001). Mucopolidosis type IV. *Mol. Genet. Metab.* *73*, 197–203.
- Baek, R.C., Martin, D.R., Cox, N.R., and Seyfried, T.N. (2009). Comparative analysis of brain lipids in mice, cats, and humans with Sandhoff disease. *Lipids* *44*, 197–205.
- Ballabio, A. (2009). Disease pathogenesis explained by basic science: lysosomal storage diseases as autophagocytic disorders. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* *47 Suppl 1*, S34–38.
- Ballabio, A. (2016). The awesome lysosome. *EMBO Mol. Med.* *8*, 73–76.
- Beetz, C., Koch, N., Khundadze, M., Zimmer, G., Nietzsche, S., Hertel, N., Huebner, A.-K., Mumtaz, R., Schweizer, M., Dirren, E., et al. (2013). A spastic paraplegia mouse model reveals REEP1-dependent ER shaping. *J. Clin. Invest.* *123*, 4273–4282.
- Bertolin, G., Ferrando-Miguel, R., Jacoupy, M., Traver, S., Grenier, K., Greene, A.W., Dauphin, A., Waharte, F., Bayot, A., Salamero, J., et al. (2013). The TOMM machinery is a molecular switch in PINK1 and PARK2/PARKIN-dependent mitochondrial clearance. *Autophagy* *9*, 1801–1817.
- Bindu, P.S., Gayathri, N., Yasha, T.C., Kovoov, J.M.E., Subasree, R., Rao, S., Panda, S., and Pal, P.K. (2008). A variant form of mucopolidosis IV: report on 4 patients from the Indian subcontinent. *J. Child Neurol.* *23*, 1443–1446.
- Bird, S., Hadjimichael, E., Mehta, A., Ramaswami, U., and Hughes, D. (2017). Fabry disease and incidence of cancer. *Orphanet J. Rare Dis.* *12*, 150.
- Blackstone, C. (2012). Cellular pathways of hereditary spastic paraplegia. *Annu. Rev. Neurosci.* *35*, 25–47.
- Blasco, H., Mavel, S., Corcia, P., and Gordon, P.H. (2014). The glutamate hypothesis in ALS: pathophysiology and drug development. *Curr. Med. Chem.* *21*, 3551–3575.
- Blott, E.J., and Griffiths, G.M. (2002). Secretory lysosomes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *3*, 122–131.
- Boccuto, L., Aoki, K., Flanagan-Steet, H., Chen, C.-F., Fan, X., Bartel, F., Petukh, M., Pittman, A., Saul, R., Chaubey, A., et al. (2014). A mutation in a ganglioside biosynthetic enzyme, ST3GAL5, results in salt & pepper syndrome, a neurocutaneous disorder with altered glycolipid and glycoprotein glycosylation. *Hum. Mol. Genet.* *23*, 418–433.
- Bohórquez-Hernández, A., Gratton, E., Pacheco, J., Asanov, A., and Vaca, L. (2017). Cholesterol modulates the cellular localization of Orai1 channels and its disposition among membrane domains. *Biochim. Biophys. Acta*

BBA - Mol. Cell Biol. Lipids 1862, 1481–1490.

de Bot, S.T., Burggraaff, R.C., Herkert, J.C., Schelhaas, H.J., Post, B., Diekstra, A., van Vliet, R.O., van der Knaap, M.S., Kamsteeg, E.-J., Scheffer, H., et al. (2013). Rapidly deteriorating course in Dutch hereditary spastic paraplegia type 11 patients. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* 21, 1312–1315.

Boukhris, A., Stevanin, G., Feki, I., Denis, E., Elleuch, N., Miladi, M.I., Truchetto, J., Denora, P., Belal, S., Mhiri, C., et al. (2008). Hereditary spastic paraplegia with mental impairment and thin corpus callosum in Tunisia: SPG11, SPG15, and further genetic heterogeneity. *Arch. Neurol.* 65, 393–402.

Boukhris, A., Schule, R., Loureiro, J.L., Lourenço, C.M., Mundwiller, E., Gonzalez, M.A., Charles, P., Gauthier, J., Rekik, I., Acosta Lebrigio, R.F., et al. (2013). Alteration of ganglioside biosynthesis responsible for complex hereditary spastic paraplegia. *Am. J. Hum. Genet.* 93, 118–123.

Boya, P., Reggiori, F., and Codogno, P. (2013). Emerging regulation and functions of autophagy. *Nat. Cell Biol.* 15, 713–720.

Brailoiu, E., Hooper, R., Cai, X., Brailoiu, G.C., Keebler, M.V., Dun, N.J., Marchant, J.S., and Patel, S. (2010). An ancestral deuterostome family of two-pore channels mediates nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate-dependent calcium release from acidic organelles. *J. Biol. Chem.* 285, 2897–2901.

Branchu, J., Boutry, M., Sourd, L., Depp, M., Leone, C., Corriger, A., Vallucci, M., Esteves, T., Matusiak, R., Dumont, M., et al. (2017). Loss of spatascin function alters lysosomal lipid clearance leading to upper and lower motor neuron degeneration. *Neurobiol. Dis.* 102, 21–37.

Bright, N.A., Reaves, B.J., Mullock, B.M., and Luzio, J.P. (1997). Dense core lysosomes can fuse with late endosomes and are re-formed from the resultant hybrid organelles. *J. Cell Sci.* 110 ( Pt 17), 2027–2040.

Bright, N.A., Gratian, M.J., and Luzio, J.P. (2005). Endocytic delivery to lysosomes mediated by concurrent fusion and kissing events in living cells. *Curr. Biol. CB* 15, 360–365.

Buchanan, G.R., and Handin, R.I. (1976). Platelet function in the Chediak-Higashi syndrome. *Blood* 47, 941–948.

Calcraft, P.J., Ruas, M., Pan, Z., Cheng, X., Arredouani, A., Hao, X., Tang, J., Rietdorf, K., Teboul, L., Chuang, K.-T., et al. (2009). NAADP mobilizes calcium from acidic organelles through two-pore channels. *Nature* 459, 596–600.

Cang, C., Zhou, Y., Navarro, B., Seo, Y.-J., Aranda, K., Shi, L., Battaglia-Hsu, S., Nissim, I., Clapham, D.E., and Ren, D. (2013). mTOR regulates lysosomal ATP-sensitive two-pore Na<sup>(+)</sup> channels to adapt to metabolic state. *Cell* 152, 778–790.

Carrasco, S., and Meyer, T. (2011). STIM proteins and the endoplasmic reticulum-plasma membrane junctions. *Annu. Rev. Biochem.* 80, 973–1000.

Chang, J., Lee, S., and Blackstone, C. (2014). Spastic paraplegia proteins spastizin and spatascin mediate autophagic lysosome reformation. *J. Clin. Invest.* 124, 5249–5262.

Chen, Y., and Yu, L. (2017). Recent progress in autophagic lysosome reformation. *Traffic Cph. Den.* 18, 358–361.

Cheng, X., Zhang, X., Gao, Q., Ali Samie, M., Azar, M., Tsang, W.L., Dong, L., Sahoo, N., Li, X., Zhuo, Y., et al. (2014). The intracellular Ca<sup>2+</sup> channel MCOLN1 is required for sarcolemma repair to prevent muscular dystrophy. *Nat. Med.* 20, 1187–1192.

Cherra, S.J., and Chu, C.T. (2008). Autophagy in neuroprotection and neurodegeneration: A question of balance. *Future Neurol.* 3, 309–323.

Choi, T.G., and Kim, S.S. (2013). Autophagy in Redox Signalling. *Hanyang Med. Rev.* 33, 83.

Christensen, K.A., Myers, J.T., and Swanson, J.A. (2002). pH-dependent regulation of lysosomal calcium in macrophages. *J. Cell Sci.* 115, 599–607.

Chu, B.-B., Liao, Y.-C., Qi, W., Xie, C., Du, X., Wang, J., Yang, H., Miao, H.-H., Li, B.-L., and Song, B.-L. (2015). Cholesterol transport through lysosome-peroxisome membrane contacts. *Cell* 161, 291–306.

Churchill, G.C., Okada, Y., Thomas, J.M., Genazzani, A.A., Patel, S., and Galione, A. (2002). NAADP mobilizes Ca<sup>(2+)</sup> from reserve granules, lysosome-related organelles, in sea urchin eggs. *Cell* 111, 703–708.

Ciechanover, A. (2005). Proteolysis: from the lysosome to ubiquitin and the proteasome. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 79–87.

- Clapham, D.E. (2007). Calcium Signaling. *Cell* *131*, 1047–1058.
- Cologna, S.M., Cluzeau, C.V.M., Yanjanin, N.M., Blank, P.S., Dail, M.K., Siebel, S., Toth, C.L., Wassif, C.A., Lieberman, A.P., and Porter, F.D. (2014). Human and mouse neuroinflammation markers in Niemann-Pick disease, type C1. *J. Inherit. Metab. Dis.* *37*, 83–92.
- Cougnoux, A., Cluzeau, C., Mitra, S., Li, R., Williams, I., Burkert, K., Xu, X., Wassif, C.A., Zheng, W., and Porter, F.D. (2016). Necroptosis in Niemann-Pick disease, type C1: a potential therapeutic target. *Cell Death Dis.* *7*, e2147.
- Coutelier, M., Goizet, C., Durr, A., Habarou, F., Morais, S., Dionne-Laporte, A., Tao, F., Konop, J., Stoll, M., Charles, P., et al. (2015). Alteration of ornithine metabolism leads to dominant and recessive hereditary spastic paraplegia. *Brain J. Neurol.* *138*, 2191–2205.
- Damme, M., Stroobants, S., Walkley, S.U., Lüllmann-Rauch, R., D'Hooge, R., Fogh, J., Saftig, P., Lübke, T., and Blanz, J. (2011). Cerebellar Alterations and Gait Defects as Therapeutic Outcome Measures for Enzyme Replacement Therapy in  $\alpha$ -Mannosidosis. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *70*, 83–94.
- Daoud, H., Zhou, S., Noreau, A., Sabbagh, M., Belzil, V., Dionne-Laporte, A., Tranchant, C., Dion, P., and Rouleau, G.A. (2012). Exome sequencing reveals SPG11 mutations causing juvenile ALS. *Neurobiol. Aging* *33*, 839.e5-9.
- Dawson, J.C., Legg, J.A., and Machesky, L.M. (2006). Bar domain proteins: a role in tubulation, scission and actin assembly in clathrin-mediated endocytosis. *Trends Cell Biol.* *16*, 493–498.
- Dayam, R.M., Saric, A., Shilliday, R.E., and Botelho, R.J. (2015). The Phosphoinositide-Gated Lysosomal Ca(2+) Channel, TRPML1, Is Required for Phagosome Maturation. *Traffic Cph. Den.* *16*, 1010–1026.
- De Duve, C., and Wattiaux, R. (1966). Functions of lysosomes. *Annu. Rev. Physiol.* *28*, 435–492.
- De Strooper, B., and Karran, E. (2016). The Cellular Phase of Alzheimer's Disease. *Cell* *164*, 603–615.
- Deluca, G.C., Ebers, G.C., and Esiri, M.M. (2004). The extent of axonal loss in the long tracts in hereditary spastic paraplegia. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* *30*, 576–584.
- Denora, P.S., Smets, K., Zolfanelli, F., Ceuterick-de Groote, C., Casali, C., Deconinck, T., Sieben, A., Gonzales, M., Zuchner, S., Darios, F., et al. (2016). Motor neuron degeneration in spastic paraplegia 11 mimics amyotrophic lateral sclerosis lesions. *Brain J. Neurol.* *139*, 1723–1734.
- Derler, I., Jardin, I., Stathopoulos, P.B., Muik, M., Fahrner, M., Zayats, V., Pandey, S.K., Poteser, M., Lackner, B., Absolonova, M., et al. (2016). Cholesterol modulates Orai1 channel function. *Sci. Signal.* *9*, ra10.
- Di Paola, S., Scotto-Rosato, A., and Medina, D.L. (2017). TRPML1: The Ca((2+))retaker of the lysosome. *Cell Calcium*.
- Di Rocco, M., Barone, R., Madeo, A., and Fiumara, A. (2015). Miglustat Does Not Prevent Neurological Involvement in Niemann Pick C Disease. *Pediatr. Neurol.* *53*, e15.
- Dong, X., Shen, D., Wang, X., Dawson, T., Li, X., Zhang, Q., Cheng, X., Zhang, Y., Weisman, L.S., Delling, M., et al. (2010). PI(3,5)P(2) controls membrane trafficking by direct activation of mucolipin Ca(2+) release channels in the endolysosome. *Nat. Commun.* *1*, 38.
- Du, W., Su, Q.P., Chen, Y., Zhu, Y., Jiang, D., Rong, Y., Zhang, S., Zhang, Y., Ren, H., Zhang, C., et al. (2016). Kinesin 1 Drives Autolysosome Tubulation. *Dev. Cell* *37*, 326–336.
- Eskelinen, E.-L. (2006). Roles of LAMP-1 and LAMP-2 in lysosome biogenesis and autophagy. *Mol. Aspects Med.* *27*, 495–502.
- Esmon, C.T. (2000). Regulation of blood coagulation. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Protein Struct. Mol. Enzymol.* *1477*, 349–360.
- Esteves, T., Durr, A., Mundwiler, E., Loureiro, J.L., Boutry, M., Gonzalez, M.A., Gauthier, J., El-Hachimi, K.H., Depienne, C., Muriel, M.-P., et al. (2014). Loss of association of REEP2 with membranes leads to hereditary spastic paraplegia. *Am. J. Hum. Genet.* *94*, 268–277.
- Falk, J., Rohde, M., Bekhite, M.M., Neugebauer, S., Hemmerich, P., Kiehntopf, M., Deufel, T., Hübner, C.A., and Beetz, C. (2014). Functional mutation analysis provides evidence for a role of REEP1 in lipid droplet biology. *Hum. Mutat.* *35*, 497–504.
- Farukhi, F., Dakkouri, C., Wang, H., Wiznitzer, M., and Traboulsi, E.I. (2006). Etiology of vision loss in

- ganglioside GM3 synthase deficiency. *Ophthalmic Genet.* 27, 89–91.
- Feng, X., and Yang, J. (2016). Lysosomal Calcium in Neurodegeneration. *Messenger* 5, 56–66.
- Feng, X., Xiong, J., Lu, Y., Xia, X., and Zhu, M.X. (2014). Differential mechanisms of action of the mucolipin synthetic agonist, ML-SA1, on insect TRPML and mammalian TRPML1. *Cell Calcium* 56, 446–456.
- Fidziańska, A., Walczak, E., and Walski, M. (2007). Abnormal chaperone-mediated autophagy (CMA) in cardiomyocytes of a boy with Danon disease. *Folia Neuropathol.* 45, 133–139.
- Fragaki, K., Ait-El-Mkadem, S., Chausseot, A., Gire, C., Mengual, R., Bonesso, L., Bénéteau, M., Ricci, J.-E., Desquirit-Dumas, V., Procaccio, V., et al. (2013). Refractory epilepsy and mitochondrial dysfunction due to GM3 synthase deficiency. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* 21, 528–534.
- Fraldi, A., Annunziata, F., Lombardi, A., Kaiser, H.-J., Medina, D.L., Spampinato, C., Fedele, A.O., Polishchuk, R., Sorrentino, N.C., Simons, K., et al. (2010). Lysosomal fusion and SNARE function are impaired by cholesterol accumulation in lysosomal storage disorders. *EMBO J.* 29, 3607–3620.
- Fütterer, K., and Machesky, L.M. (2007). “Wunder” F-BAR domains: going from pits to vesicles. *Cell* 129, 655–657.
- Galan, C., Woodard, G.E., Dionisio, N., Salido, G.M., and Rosado, J.A. (2010). Lipid rafts modulate the activation but not the maintenance of store-operated Ca(2+) entry. *Biochim. Biophys. Acta* 1803, 1083–1093.
- Garrity, A.G., Wang, W., Collier, C.M., Levey, S.A., Gao, Q., and Xu, H. (2016). The endoplasmic reticulum, not the pH gradient, drives calcium refilling of lysosomes. *ELife* 5.
- Ginzburg, L., and Futerman, A.H. (2005). Defective calcium homeostasis in the cerebellum in a mouse model of Niemann-Pick A disease. *J. Neurochem.* 95, 1619–1628.
- Goberdhan, D.C.I., Wilson, C., and Harris, A.L. (2016). Amino Acid Sensing by mTORC1: Intracellular Transporters Mark the Spot. *Cell Metab.* 23, 580–589.
- Goldman, S.D.B., and Krise, J.P. (2010). Niemann-Pick C1 Functions Independently of Niemann-Pick C2 in the Initial Stage of Retrograde Transport of Membrane-impermeable Lysosomal Cargo. *J. Biol. Chem.* 285, 4983–4994.
- Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (2009). History of Discovery: The LDL Receptor. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 29, 431–438.
- Gwozdz, T., Dutko-Gwozdz, J., Schafer, C., and Bolotina, V.M. (2012). Overexpression of Orail and STIM1 proteins alters regulation of store-operated Ca<sup>2+</sup> entry by endogenous mediators. *J. Biol. Chem.* 287, 22865–22872.
- Hanein, S., Martin, E., Boukhris, A., Byrne, P., Goizet, C., Hamri, A., Benomar, A., Lossos, A., Denora, P., Fernandez, J., et al. (2008). Identification of the SPG15 Gene, Encoding Spastizin, as a Frequent Cause of Complicated Autosomal-Recessive Spastic Paraplegia, Including Kjellin Syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 82, 992–1002.
- Hara, T., Nakamura, K., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakahara, Y., Suzuki-Migishima, R., Yokoyama, M., Mishima, K., Saito, I., Okano, H., et al. (2006). Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature* 441, 885–889.
- Harding, A.E. (1983). Classification of the hereditary ataxias and paraplegias. *Lancet Lond. Engl.* 1, 1151–1155.
- Harlalka, G.V., Lehman, A., Chioza, B., Baple, E.L., Maroofian, R., Cross, H., Sreekantan-Nair, A., Priestman, D.A., Al-Turki, S., McEntagart, M.E., et al. (2013). Mutations in B4GALNT1 (GM2 synthase) underlie a new disorder of ganglioside biosynthesis. *Brain J. Neurol.* 136, 3618–3624.
- Hirst, J., Barlow, L.D., Francisco, G.C., Sahlender, D.A., Seaman, M.N., Dacks, J.B., and Robinson, M.S. (2011). The fifth adaptor protein complex. *PLoS Biol.* 9, e1001170.
- Hirst, J., Borner, G.H., Edgar, J., Hein, M.Y., Mann, M., Buchholz, F., Antrobus, R., and Robinson, M.S. (2013). Interaction between AP-5 and the hereditary spastic paraplegia proteins SPG11 and SPG15. *Mol. Biol. Cell* 24, 2558–2569.
- Hirst, J., Edgar, J.R., Esteves, T., Darios, F., Madeo, M., Chang, J., Roda, R.H., Dürr, A., Anheim, M., Gellera, C., et al. (2015). Loss of AP-5 results in accumulation of aberrant endolysosomes: defining a new type of lysosomal storage disease. *Hum. Mol. Genet.* 24, 4984–4996.

- Hogan, P.G., and Rao, A. (2015). Store-operated calcium entry: mechanisms and modulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *460*, 40–49.
- Infante, R.E., Wang, M.L., Radhakrishnan, A., Kwon, H.J., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (2008). NPC2 facilitates bidirectional transfer of cholesterol between NPC1 and lipid bilayers, a step in cholesterol egress from lysosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 15287–15292.
- Inloes, J.M., Hsu, K.-L., Dix, M.M., Viader, A., Masuda, K., Takei, T., Wood, M.R., and Cravatt, B.F. (2014). The hereditary spastic paraplegia-related enzyme DDHD2 is a principal brain triglyceride lipase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, 14924–14929.
- Jara, E., Hidalgo, M.A., Hancke, J.L., Hidalgo, A.I., Brauchi, S., Nuñez, L., Villalobos, C., and Burgos, R.A. (2014). Delphinidin activates NFAT and induces IL-2 production through SOCE in T cells. *Cell Biochem. Biophys.* *68*, 497–509.
- Jo, Y., and DeBose-Boyd, R.A. (2010). Control of Cholesterol Synthesis through Regulated ER-Associated Degradation of HMG CoA Reductase. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* *45*, 185–198.
- Kabayama, K., Sato, T., Saito, K., Loberto, N., Prinetti, A., Sonnino, S., Kinjo, M., Igarashi, Y., and Inokuchi, J. (2007). Dissociation of the insulin receptor and caveolin-1 complex by ganglioside GM3 in the state of insulin resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 13678–13683.
- Kaesler, P.S., and Regehr, W.G. (2014). Molecular mechanisms for synchronous, asynchronous, and spontaneous neurotransmitter release. *Annu. Rev. Physiol.* *76*, 333–363.
- Kalanj, S., Kracun, I., Rosner, H., and Cosović, C. (1991). Regional distribution of brain gangliosides in Alzheimer's disease. *Neurol. Croat. Glas. Udruženja Neurol. Jugosl. Off. J. Yugosl. Neurol. Assoc.* *40*, 269–281.
- Kanerva, K., Uronen, R.-L., Blom, T., Li, S., Bittman, R., Lappalainen, P., Peränen, J., Raposo, G., and Ikonen, E. (2013). LDL cholesterol recycles to the plasma membrane via a Rab8a-Myosin5b-actin-dependent membrane transport route. *Dev. Cell* *27*, 249–262.
- van der Kant, R., and Neefjes, J. (2014). Small regulators, major consequences - Ca<sup>2+</sup> and cholesterol at the endosome-ER interface. *J. Cell Sci.* *127*, 929–938.
- Kara, E., Tucci, A., Manzoni, C., Lynch, D.S., Elpidorou, M., Bettencourt, C., Chelban, V., Manole, A., Hamed, S.A., Haridy, N.A., et al. (2016). Genetic and phenotypic characterization of complex hereditary spastic paraplegia. *Brain J. Neurol.* *139*, 1904–1918.
- Karimzadeh, P., Jafari, N., Nejad Biglari, H., Jabbeh Dari, S., Ahmad Abadi, F., Alaei, M.-R., Nemati, H., Saket, S., Tonekaboni, S.H., Taghdiri, M.-M., et al. (2014). GM2-Gangliosidosis (Sandhoff and Tay Sachs disease): Diagnosis and Neuroimaging Findings (An Iranian Pediatric Case Series). *Iran. J. Child Neurol.* *8*, 55–60.
- Kennedy, B.E., Madreiter, C.T., Vishnu, N., Malli, R., Graier, W.F., and Karten, B. (2014). Adaptations of energy metabolism associated with increased levels of mitochondrial cholesterol in Niemann-Pick type C1-deficient cells. *J. Biol. Chem.* *289*, 16278–16289.
- Khundadze, M., Kollmann, K., Koch, N., Biskup, C., Nietzsche, S., Zimmer, G., Hennings, J.C., Huebner, A.K., Symmank, J., Jahic, A., et al. (2013). A Hereditary Spastic Paraplegia Mouse Model Supports a Role of ZFYVE26/SPASTIZIN for the Endolysosomal System. *PLoS Genet.* *9*, e1003988.
- Kilpatrick, B.S., Eden, E.R., Schapira, A.H., Futter, C.E., and Patel, S. (2013). Direct mobilisation of lysosomal Ca<sup>2+</sup> triggers complex Ca<sup>2+</sup> signals. *J. Cell Sci.* *126*, 60–66.
- Kilpatrick, B.S., Yates, E., Grimm, C., Schapira, A.H., and Patel, S. (2016). Endo-lysosomal TRP mucolipin-1 channels trigger global ER Ca<sup>2+</sup> release and Ca<sup>2+</sup> influx. *J. Cell Sci.* *129*, 3859–3867.
- Kim, M., Sandford, E., Gatica, D., Qiu, Y., Liu, X., Zheng, Y., Schulman, B.A., Xu, J., Semple, I., Ro, S.-H., et al. (2016). Mutation in ATG5 reduces autophagy and leads to ataxia with developmental delay. *ELife* *5*.
- Klebe, S., Stevanin, G., and Depienne, C. (2015). Clinical and genetic heterogeneity in hereditary spastic paraplegias: from SPG1 to SPG72 and still counting. *Rev. Neurol. (Paris)* *171*, 505–530.
- Klemm, R.W., Norton, J.P., Cole, R.A., Li, C.S., Park, S.H., Crane, M.M., Li, L., Jin, D., Boye-Doe, A., Liu, T.Y., et al. (2013). A conserved role for atlastin GTPases in regulating lipid droplet size. *Cell Rep.* *3*, 1465–1475.
- Koch, G.L. (1990). The endoplasmic reticulum and calcium storage. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* *12*, 527–531.
- Komatsu, M., Waguri, S., Chiba, T., Murata, S., Iwata, J., Tanida, I., Ueno, T., Koike, M., Uchiyama, Y.,

- Kominami, E., et al. (2006). Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature* *441*, 880–884.
- Komatsu, M., Waguri, S., Koike, M., Sou, Y.-S., Ueno, T., Hara, T., Mizushima, N., Iwata, J.-I., Ezaki, J., Murata, S., et al. (2007). Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice. *Cell* *131*, 1149–1163.
- Kopitz, J., Arnold, A., Meissner, T., and Cantz, M. (1993). Protein catabolism in fibroblasts cultured from patients with mucopolidosis II and other lysosomal disorders. *Biochem. J.* *295* ( Pt 2), 577–580.
- Kostic, M., Zivkovic, N., and Stojanovic, I. (2013). Multiple sclerosis and glutamate excitotoxicity. *Rev. Neurosci.* *24*, 71–88.
- Kracun, I., Kalanj, S., Talan-Hranilovic, J., and Cosovic, C. (1992). Cortical distribution of gangliosides in Alzheimer's disease. *Neurochem. Int.* *20*, 433–438.
- Kraft, M.L. (2013). Plasma membrane organization and function: moving past lipid rafts. *Mol. Biol. Cell* *24*, 2765–2768.
- Kwiatkowska, K., Marszałek-Sadowska, E., Traczyk, G., Koprowski, P., Musielak, M., Lugowska, A., Kulma, M., Grzelczyk, A., and Sobota, A. (2014). Visualization of cholesterol deposits in lysosomes of Niemann-Pick type C fibroblasts using recombinant perfringolysin O. *Orphanet J. Rare Dis.* *9*, 64.
- Lajoie, P., and Nabi, I.R. (2010). Lipid rafts, caveolae, and their endocytosis. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* *282*, 135–163.
- Lanner, J.T. (2012). Ryanodine receptor physiology and its role in disease. *Adv. Exp. Med. Biol.* *740*, 217–234.
- Lawson, C.A., and Martin, D.R. (2016). Animal models of GM2 gangliosidosis: utility and limitations. *Appl. Clin. Genet.* *9*, 111–120.
- Lewerenz, J., and Maher, P. (2015). Chronic Glutamate Toxicity in Neurodegenerative Diseases-What is the Evidence? *Front. Neurosci.* *9*, 469.
- Li, H., Turley, S.D., Liu, B., Repa, J.J., and Dietschy, J.M. (2008). GM2/GD2 and GM3 gangliosides have no effect on cellular cholesterol pools or turnover in normal or NPC1 mice. *J. Lipid Res.* *49*, 1816–1828.
- Li, J., Yan, B., Si, H., Peng, X., Zhang, S.L., and Hu, J. (2017a). Atlastin regulates store-operated calcium entry for nerve growth factor-induced neurite outgrowth. *Sci. Rep.* *7*.
- Li, R., Hao, J., Fujiwara, H., Xu, M., Yang, S., Dai, S., Long, Y., Swaroop, M., Li, C., Vu, M., et al. (2017b). Analytical Characterization of Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin for Pharmacological Activity to Reduce Lysosomal Cholesterol Accumulation in Niemann-Pick Disease Type C1 Cells. *Assay Drug Dev. Technol.* *15*, 154–166.
- Li, X., Wang, X., Zhang, X., Zhao, M., Tsang, W.L., Zhang, Y., Yau, R.G.W., Weisman, L.S., and Xu, H. (2013). Genetically encoded fluorescent probe to visualize intracellular phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate localization and dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 21165–21170.
- Li, X., Ryzdzewski, N., Hider, A., Zhang, X., Yang, J., Wang, W., Gao, Q., Cheng, X., and Xu, H. (2016). A molecular mechanism to regulate lysosome motility for lysosome positioning and tubulation. *Nat. Cell Biol.* *18*, 404–417.
- Liang, C.-C., Wang, C., Peng, X., Gan, B., and Guan, J.-L. (2010). Neural-specific deletion of FIP200 leads to cerebellar degeneration caused by increased neuronal death and axon degeneration. *J. Biol. Chem.* *285*, 3499–3509.
- Lièvremon, J.P., Rizzuto, R., Hendershot, L., and Meldolesi, J. (1997). BiP, a major chaperone protein of the endoplasmic reticulum lumen, plays a direct and important role in the storage of the rapidly exchanging pool of Ca<sup>2+</sup>. *J. Biol. Chem.* *272*, 30873–30879.
- Lippai, M., and Löw, P. (2014). The role of the selective adaptor p62 and ubiquitin-like proteins in autophagy. *BioMed Res. Int.* *2014*, 832704.
- Liscum, L., and Faust, J.R. (1989). The intracellular transport of low density lipoprotein-derived cholesterol is inhibited in Chinese hamster ovary cells cultured with 3-beta-[2-(diethylamino)ethoxy]androst-5-en-17-one. *J. Biol. Chem.* *264*, 11796–11806.
- Liu, B., Li, H., Repa, J.J., Turley, S.D., and Dietschy, J.M. (2008). Genetic variations and treatments that affect the lifespan of the NPC1 mouse. *J. Lipid Res.* *49*, 663–669.

- Liu, Y., Wu, Y.P., Wada, R., Neufeld, E.B., Mullin, K.A., Howard, A.C., Pentchev, P.G., Vanier, M.T., Suzuki, K., and Proia, R.L. (2000). Alleviation of neuronal ganglioside storage does not improve the clinical course of the Niemann-Pick C disease mouse. *Hum. Mol. Genet.* *9*, 1087–1092.
- Lloyd-Evans, E., and Platt, F.M. (2011). Lysosomal Ca<sup>2+</sup> homeostasis: role in pathogenesis of lysosomal storage diseases. *Cell Calcium* *50*, 200–205.
- Lloyd-Evans, E., Morgan, A.J., He, X., Smith, D.A., Elliot-Smith, E., Sillence, D.J., Churchill, G.C., Schuchman, E.H., Galione, A., and Platt, F.M. (2008). Niemann-Pick disease type C1 is a sphingosine storage disease that causes deregulation of lysosomal calcium. *Nat. Med.* *14*, 1247–1255.
- Lo Giudice, T., Lombardi, F., Santorelli, F.M., Kawarai, T., and Orlandi, A. (2014). Hereditary spastic paraplegia: clinical-genetic characteristics and evolving molecular mechanisms. *Exp. Neurol.* *261*, 518–539.
- Lopez, M.E., Klein, A.D., Dimbil, U.J., and Scott, M.P. (2011). Anatomically defined neuron-based rescue of neurodegenerative Niemann-Pick type C disorder. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *31*, 4367–4378.
- López-Sanjurjo, C.I., Tovey, S.C., Prole, D.L., and Taylor, C.W. (2013). Lysosomes shape Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>-evoked Ca<sup>2+</sup> signals by selectively sequestering Ca<sup>2+</sup> released from the endoplasmic reticulum. *J. Cell Sci.* *126*, 289–300.
- Lu, F., Liang, Q., Abi-Mosleh, L., Das, A., De Brabander, J.K., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (2015). Identification of NPC1 as the target of U18666A, an inhibitor of lysosomal cholesterol export and Ebola infection. *ELife* *4*.
- Luzio, J.P., Pryor, P.R., and Bright, N.A. (2007). Lysosomes: fusion and function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *8*, 622–632.
- Lyseng-Williamson, K.A. (2014). Miglustat: a review of its use in Niemann-Pick disease type C. *Drugs* *74*, 61–74.
- Maekawa, M., Yang, Y., and Fairn, G.D. (2016). Perfringolysin O Theta Toxin as a Tool to Monitor the Distribution and Inhomogeneity of Cholesterol in Cellular Membranes. *Toxins* *8*.
- Magalhaes, J., Gegg, M.E., Migdalska-Richards, A., Doherty, M.K., Whitfield, P.D., and Schapira, A.H.V. (2016). Autophagic lysosome reformation dysfunction in glucocerebrosidase deficient cells: relevance to Parkinson disease. *Hum. Mol. Genet.* *25*, 3432–3445.
- Majewski, L., and Kuznicki, J. (2015). SOCE in neurons: Signaling or just refilling? *Biochim. Biophys. Acta* *1853*, 1940–1952.
- Martin, E., Yanicostas, C., Rastetter, A., Naini, S.M.A., Maouedj, A., Kabashi, E., Rivaud-Péchoux, S., Brice, A., Stevanin, G., and Soussi-Yanicostas, N. (2012). Spatacsin and spatizinc act in the same pathway required for proper spinal motor neuron axon outgrowth in zebrafish. *Neurobiol. Dis.* *48*, 299–308.
- Martinez-Vicente, M., Tallozy, Z., Wong, E., Tang, G., Koga, H., Kaushik, S., de Vries, R., Arias, E., Harris, S., Sulzer, D., et al. (2010). Cargo recognition failure is responsible for inefficient autophagy in Huntington's disease. *Nat. Neurosci.* *13*, 567–576.
- Matsuda, N., Sato, S., Shiba, K., Okatsu, K., Saisho, K., Gautier, C.A., Sou, Y.-S., Saiki, S., Kawajiri, S., Sato, F., et al. (2010). PINK1 stabilized by mitochondrial depolarization recruits Parkin to damaged mitochondria and activates latent Parkin for mitophagy. *J. Cell Biol.* *189*, 211–221.
- Mattson, M.P. (2007). Calcium and neurodegeneration. *Aging Cell* *6*, 337–350.
- Maue, R.A., Burgess, R.W., Wang, B., Wooley, C.M., Seburn, K.L., Vanier, M.T., Rogers, M.A., Chang, C.C., Chang, T.-Y., Harris, B.T., et al. (2012). A novel mouse model of Niemann-Pick type C disease carrying a D1005G-Npc1 mutation comparable to commonly observed human mutations. *Hum. Mol. Genet.* *21*, 730–750.
- Maus, M., Cuk, M., Patel, B., Lian, J., Ouimet, M., Kaufmann, U., Yang, J., Horvath, R., Hornig-Do, H.-T., Chrzanowska-Lightowlers, Z.M., et al. (2017). Store-Operated Ca<sup>2+</sup> Entry Controls Induction of Lipolysis and the Transcriptional Reprogramming to Lipid Metabolism. *Cell Metab.* *25*, 698–712.
- McGlynn, R., Dobrenis, K., and Walkley, S.U. (2004). Differential subcellular localization of cholesterol, gangliosides, and glycosaminoglycans in murine models of mucopolysaccharide storage disorders. *J. Comp. Neurol.* *480*, 415–426.
- Medina, D.L., Di Paola, S., Peluso, I., Armani, A., De Stefani, D., Venditti, R., Montefusco, S., Scotto-Rosato, A., Prezioso, C., Forrester, A., et al. (2015). Lysosomal calcium signalling regulates autophagy through calcineurin

and TFEB. *Nat. Cell Biol.* *17*, 288–299.

Mekahli, D., Bultynck, G., Parys, J.B., De Smedt, H., and Missiaen, L. (2011). Endoplasmic-Reticulum Calcium Depletion and Disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *3*, a004317–a004317.

Menzies, F.M., Fleming, A., Caricasole, A., Bento, C.F., Andrews, S.P., Ashkenazi, A., Füllgrabe, J., Jackson, A., Jimenez Sanchez, M., Karabiyik, C., et al. (2017). Autophagy and Neurodegeneration: Pathogenic Mechanisms and Therapeutic Opportunities. *Neuron* *93*, 1015–1034.

Micsenyi, M.C., Dobrenis, K., Stephney, G., Pickel, J., Vanier, M.T., Slaugenhaupt, S.A., and Walkley, S.U. (2009). Neuropathology of the *Mcoln1*<sup>-/-</sup> Knockout Mouse Model of Mucopolidosis Type IV. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *68*, 125–135.

Mindell, J.A. (2012). Lysosomal acidification mechanisms. *Annu. Rev. Physiol.* *74*, 69–86.

Mishra, H.K., Prots, I., Havlicek, S., Kohl, Z., Perez-Branguli, F., Boerstler, T., Anneser, L., Minakaki, G., Wend, H., Hampl, M., et al. (2016). GSK3 $\beta$ -dependent dysregulation of neurodevelopment in SPG11-patient iPSC model. *Ann. Neurol.*

Mizushima, N., and Levine, B. (2010). Autophagy in mammalian development and differentiation. *Nat. Cell Biol.* *12*, 823–830.

Mizushima, N., Yamamoto, A., Matsui, M., Yoshimori, T., and Ohsumi, Y. (2004). In Vivo Analysis of Autophagy in Response to Nutrient Starvation Using Transgenic Mice Expressing a Fluorescent Autophagosome Marker. *Mol. Biol. Cell* *15*, 1101–1111.

Molander-Melin, M., Blennow, K., Bogdanovic, N., Dellheden, B., Månsson, J.-E., and Fredman, P. (2005). Structural membrane alterations in Alzheimer brains found to be associated with regional disease development; increased density of gangliosides GM1 and GM2 and loss of cholesterol in detergent-resistant membrane domains. *J. Neurochem.* *92*, 171–182.

Montecchiani, C., Pedace, L., Lo Giudice, T., Casella, A., Mearini, M., Gaudiello, F., Pedroso, J.L., Terracciano, C., Caltagirone, C., Massa, R., et al. (2016). ALS5/SPG11/KIAA1840 mutations cause autosomal recessive axonal Charcot-Marie-Tooth disease. *Brain J. Neurol.* *139*, 73–85.

Morgan, A.J., Platt, F.M., Lloyd-Evans, E., and Galione, A. (2011). Molecular mechanisms of endolysosomal Ca<sup>2+</sup> signalling in health and disease. *Biochem. J.* *439*, 349–374.

Müller vom Hagen, J., Karle, K.N., Schüle, R., Krägeloh-Mann, I., and Schöls, L. (2014). Leukodystrophies underlying cryptic spastic paraparesis: frequency and phenotype in 76 patients. *Eur. J. Neurol.* *21*, 983–988.

Mullock, B.M., Bright, N.A., Fearon, C.W., Gray, S.R., and Luzio, J.P. (1998). Fusion of lysosomes with late endosomes produces a hybrid organelle of intermediate density and is NSF dependent. *J. Cell Biol.* *140*, 591–601.

Murmu, R.P., Martin, E., Rastetter, A., Esteves, T., Muriel, M.-P., El Hachimi, K.H., Denora, P.S., Dauphin, A., Fernandez, J.C., Duyckaerts, C., et al. (2011). Cellular distribution and subcellular localization of spatacin and spatizin, two proteins involved in hereditary spastic paraplegia. *Mol. Cell. Neurosci.* *47*, 191–202.

Nah, J., Yuan, J., and Jung, Y.-K. (2015). Autophagy in neurodegenerative diseases: from mechanism to therapeutic approach. *Mol. Cells* *38*, 381–389.

Nakano, Y., Fujitani, K., Kurihara, J., Ragan, J., Usui-Aoki, K., Shimoda, L., Lukacovich, T., Suzuki, K., Sezaki, M., Sano, Y., et al. (2001). Mutations in the novel membrane protein spinster interfere with programmed cell death and cause neural degeneration in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell. Biol.* *21*, 3775–3788.

Nakatogawa, H., Suzuki, K., Kamada, Y., and Ohsumi, Y. (2009). Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *10*, 458–467.

Niimi, K., Nishioka, C., Miyamoto, T., Takahashi, E., Miyoshi, I., Itakura, C., and Yamashita, T. (2011). Impairment of neuropsychological behaviors in ganglioside GM3-knockout mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *406*, 524–528.

Nixon, R.A. (2013). The role of autophagy in neurodegenerative disease. *Nat. Med.* *19*, 983–997.

Novarino, G., Fenstermaker, A.G., Zaki, M.S., Hofree, M., Silhavy, J.L., Heiberg, A.D., Abdellateef, M., Rosti, B., Scott, E., Mansour, L., et al. (2014). Exome sequencing links corticospinal motor neuron disease to common neurodegenerative disorders. *Science* *343*, 506–511.

Nuytemans, K., Theuns, J., Cruts, M., and Van Broeckhoven, C. (2010). Genetic etiology of Parkinson disease associated with mutations in the SNCA, PARK2, PINK1, PARK7, and LRRK2 genes: a mutation update. *Hum.*

Mutat. 31, 763–780.

Ochaba, J., Lukacsovich, T., Csikos, G., Zheng, S., Margulis, J., Salazar, L., Mao, K., Lau, A.L., Yeung, S.Y., Humbert, S., et al. (2014). Potential function for the Huntingtin protein as a scaffold for selective autophagy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 16889–16894.

Ohara, S., Ukita, Y., Ninomiya, H., and Ohno, K. (2004). Axonal dystrophy of dorsal root ganglion sensory neurons in a mouse model of Niemann-Pick disease type C. *Exp. Neurol.* 187, 289–298.

Onyenwoke, R.U., and Brenman, J.E. (2015). Lysosomal Storage Diseases-Regulating Neurodegeneration. *J. Exp. Neurosci.* 9, 81–91.

Orlacchio, A., Babalini, C., Borreca, A., Patrono, C., Massa, R., Basaran, S., Munhoz, R.P., Rogaeva, E.A., St George-Hyslop, P.H., Bernardi, G., et al. (2010). SPATACSIN mutations cause autosomal recessive juvenile amyotrophic lateral sclerosis. *Brain J. Neurol.* 133, 591–598.

Pacheco, J., Dominguez, L., Bohórquez-Hernández, A., Asanov, A., and Vaca, L. (2016). A cholesterol-binding domain in STIM1 modulates STIM1-Orai1 physical and functional interactions. *Sci. Rep.* 6, 29634.

Palty, R., Raveh, A., Kaminsky, I., Meller, R., and Reuveny, E. (2012). SARAF inactivates the store operated calcium entry machinery to prevent excess calcium refilling. *Cell* 149, 425–438.

Pankiv, S., Clausen, T.H., Lamark, T., Brech, A., Bruun, J.-A., Outzen, H., Øvervatn, A., Bjørkøy, G., and Johansen, T. (2007). p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J. Biol. Chem.* 282, 24131–24145.

Papadopoulos, C., Orso, G., Mancuso, G., Herholz, M., Gumeni, S., Tadepalle, N., Jüngst, C., Tzschichholz, A., Schauss, A., Höning, S., et al. (2015). Spastin binds to lipid droplets and affects lipid metabolism. *PLoS Genet.* 11, e1005149.

Papp, S., Dziak, E., Michalak, M., and Opas, M. (2003). Is all of the endoplasmic reticulum created equal? The effects of the heterogeneous distribution of endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-handling proteins. *J. Cell Biol.* 160, 475–479.

Park, D.H., Wang, L., Pittock, P., Lajoie, G., and Whitehead, S.N. (2016a). Increased Expression of GM1 Detected by Electrospray Mass Spectrometry in Rat Primary Embryonic Cortical Neurons Exposed to Glutamate Toxicity. *Anal. Chem.* 88, 7844–7852.

Park, S., Ahuja, M., Kim, M.S., Brailoiu, G.C., Jha, A., Zeng, M., Baydyuk, M., Wu, L.-G., Wassif, C.A., Porter, F.D., et al. (2016b). Fusion of lysosomes with secretory organelles leads to uncontrolled exocytosis in the lysosomal storage disease mucopolidosis type IV. *EMBO Rep.* 17, 266–278.

Parodi, L., Fenu, S., Stevanin, G., and Durr, A. (2017). Hereditary spastic paraplegia: More than an upper motor neuron disease. *Rev. Neurol. (Paris)* 173, 352–360.

Patel, S., and Docampo, R. (2010). Acidic calcium stores open for business: expanding the potential for intracellular Ca<sup>2+</sup> signaling. *Trends Cell Biol.* 20, 277–286.

Patterson, M.C., Vecchio, D., Jacklin, E., Abel, L., Chadha-Boreham, H., Luzy, C., Giorgino, R., and Wraith, J.E. (2010). Long-term miglustat therapy in children with Niemann-Pick disease type C. *J. Child Neurol.* 25, 300–305.

Peake, K.B., and Vance, J.E. (2010). Defective cholesterol trafficking in Niemann-Pick C-deficient cells. *FEBS Lett.* 584, 2731–2739.

Pensato, V., Castellotti, B., Gellera, C., Pareyson, D., Ciano, C., Nanetti, L., Salsano, E., Piscosquito, G., Sarto, E., Eoli, M., et al. (2014). Overlapping phenotypes in complex spastic paraplegias SPG11, SPG15, SPG35 and SPG48. *Brain J. Neurol.* 137, 1907–1920.

Perera, R.M., and Zoncu, R. (2016). The Lysosome as a Regulatory Hub. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 32, 223–253.

Pérez-Brangulí, F., Mishra, H.K., Prots, I., Havlicek, S., Kohl, Z., Saul, D., Rummel, C., Dorca-Arevalo, J., Regensburger, M., Graef, D., et al. (2014). Dysfunction of spatacsin leads to axonal pathology in SPG11-linked hereditary spastic paraplegia. *Hum. Mol. Genet.*

Pernber, Z., Blennow, K., Bogdanovic, N., Månsson, J.-E., and Blomqvist, M. (2012). Altered distribution of the gangliosides GM1 and GM2 in Alzheimer's disease. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 33, 174–188.

Phillips, M.J., and Voeltz, G.K. (2016). Structure and function of ER membrane contact sites with other organelles. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 17, 69–82.

- Platt, F.M., Boland, B., and van der Spoel, A.C. (2012). The cell biology of disease: lysosomal storage disorders: the cellular impact of lysosomal dysfunction. *J. Cell Biol.* *199*, 723–734.
- Prakriya, M., and Lewis, R.S. (2015). Store-Operated Calcium Channels. *Physiol. Rev.* *95*, 1383–1436.
- Prole, D.L., and Taylor, C.W. (2016). Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors and their protein partners as signalling hubs. *J. Physiol.* *594*, 2849–2866.
- Pryor, P.R., Mullock, B.M., Bright, N.A., Gray, S.R., and Luzio, J.P. (2000). The role of intraorganellar Ca(2+) in late endosome-lysosome heterotypic fusion and in the reformation of lysosomes from hybrid organelles. *J. Cell Biol.* *149*, 1053–1062.
- Pryor, P.R., Reimann, F., Gribble, F.M., and Luzio, J.P. (2006). Mucolipin-1 is a lysosomal membrane protein required for intracellular lactosylceramide traffic. *Traffic Cph. Den.* *7*, 1388–1398.
- Pu, J., Guardia, C.M., Keren-Kaplan, T., and Bonifacio, J.S. (2016). Mechanisms and functions of lysosome positioning. *J. Cell Sci.* *129*, 4329–4339.
- Puri, V., Watanabe, R., Dominguez, M., Sun, X., Wheatley, C.L., Marks, D.L., and Pagano, R.E. (1999). Cholesterol modulates membrane traffic along the endocytic pathway in sphingolipid-storage diseases. *Nat. Cell Biol.* *1*, 386–388.
- Raben, N., Shea, L., Hill, V., and Plotz, P. (2009). Monitoring autophagy in lysosomal storage disorders. *Methods Enzymol.* *453*, 417–449.
- Rabinowitz, J.D., and White, E. (2010). Autophagy and metabolism. *Science* *330*, 1344–1348.
- Raffaello, A., Mammucari, C., Gherardi, G., and Rizzuto, R. (2016). Calcium at the Center of Cell Signaling: Interplay between Endoplasmic Reticulum, Mitochondria, and Lysosomes. *Trends Biochem. Sci.* *41*, 1035–1049.
- Rambold, A.S., Cohen, S., and Lippincott-Schwartz, J. (2015). Fatty acid trafficking in starved cells: regulation by lipid droplet lipolysis, autophagy, and mitochondrial fusion dynamics. *Dev. Cell* *32*, 678–692.
- Rappaport, J., Manthe, R.L., Solomon, M., Garnacho, C., and Muro, S. (2016). A Comparative Study on the Alterations of Endocytic Pathways in Multiple Lysosomal Storage Disorders. *Mol. Pharm.* *13*, 357–368.
- Renvoisé, B., Stadler, J., Singh, R., Bakowska, J.C., and Blackstone, C. (2012). Spg20<sup>-/-</sup> mice reveal multimodal functions for Troyer syndrome protein spartin in lipid droplet maintenance, cytokinesis and BMP signaling. *Hum. Mol. Genet.* *21*, 3604–3618.
- Renvoisé, B., Chang, J., Singh, R., Yonekawa, S., FitzGibbon, E.J., Mankodi, A., Vanderver, A., Schindler, A., Toro, C., Gahl, W.A., et al. (2014). Lysosomal abnormalities in hereditary spastic paraplegia types SPG15 and SPG11. *Ann. Clin. Transl. Neurol.* *1*, 379–389.
- Rihani, R., Barbar, M., Faqih, N., Halalsheh, H., Hussein, A.A., Al-Zaben, A.H., Rahman, F.A., and Sarhan, M. (2012). Unrelated cord blood transplantation can restore hematologic and immunologic functions in patients with Chediak-Higashi syndrome. *Pediatr. Transplant.* *16*, E99–E105.
- Rizzuto, R., Brini, M., Murgia, M., and Pozzan, T. (1993). Microdomains with high Ca<sup>2+</sup> close to IP<sub>3</sub>-sensitive channels that are sensed by neighboring mitochondria. *Science* *262*, 744–747.
- Rizzuto, R., Pinton, P., Carrington, W., Fay, F.S., Fogarty, K.E., Lifshitz, L.M., Tuft, R.A., and Pozzan, T. (1998). Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca<sup>2+</sup> responses. *Science* *280*, 1763–1766.
- Rizzuto, R., Marchi, S., Bonora, M., Aguiari, P., Bononi, A., De Stefani, D., Giorgi, C., Leo, S., Rimessi, A., Siviero, R., et al. (2009). Ca(2+) transfer from the ER to mitochondria: when, how and why. *Biochim. Biophys. Acta* *1787*, 1342–1351.
- Rocha, N., Kuijl, C., van der Kant, R., Janssen, L., Houben, D., Janssen, H., Zwart, W., and Neefjes, J. (2009). Cholesterol sensor ORP1L contacts the ER protein VAP to control Rab7-RILP-p150 Glued and late endosome positioning. *J. Cell Biol.* *185*, 1209–1225.
- Rong, Y., McPhee, C.K., McPhee, C., Deng, S., Huang, L., Chen, L., Liu, M., Tracy, K., Baehrecke, E.H., Baehrecke, E.H., et al. (2011). Spinster is required for autophagic lysosome reformation and mTOR reactivation following starvation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 7826–7831.
- Rong, Y., Liu, M., Ma, L., Du, W., Zhang, H., Tian, Y., Cao, Z., Li, Y., Ren, H., Zhang, C., et al. (2012). Clathrin and phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate regulate autophagic lysosome reformation. *Nat. Cell Biol.* *14*, 924–934.

- Ruas, M., Rietdorf, K., Arredouani, A., Davis, L.C., Lloyd-Evans, E., Koegel, H., Funnell, T.M., Morgan, A.J., Ward, J.A., Watanabe, K., et al. (2010). Purified TPC isoforms form NAADP receptors with distinct roles for Ca(2+) signaling and endolysosomal trafficking. *Curr. Biol. CB* 20, 703–709.
- Ruas, M., Davis, L.C., Chen, C.-C., Morgan, A.J., Chuang, K.-T., Walseth, T.F., Grimm, C., Garnham, C., Powell, T., Platt, N., et al. (2015). Expression of Ca<sup>2+</sup>-permeable two-pore channels rescues NAADP signalling in TPC-deficient cells. *EMBO J.* 34, 1743–1758.
- Rui, Y.-N., Xu, Z., Patel, B., Chen, Z., Chen, D., Tito, A., David, G., Sun, Y., Stimming, E.F., Bellen, H.J., et al. (2015). Huntingtin functions as a scaffold for selective macroautophagy. *Nat. Cell Biol.* 17, 262–275.
- Ryu, E.J., Harding, H.P., Angelastro, J.M., Vitolo, O.V., Ron, D., and Greene, L.A. (2002). Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response in cellular models of Parkinson's disease. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 22, 10690–10698.
- Saheki, Y., and De Camilli, P. (2017). Endoplasmic Reticulum-Plasma Membrane Contact Sites. *Annu. Rev. Biochem.* 86, 659–684.
- Saito, M., Chakraborty, G., Shah, R., Mao, R.-F., Kumar, A., Yang, D.-S., Dobrenis, K., and Saito, M. (2012). Elevation of GM2 ganglioside during ethanol-induced apoptotic neurodegeneration in the developing mouse brain. *J. Neurochem.* 121, 649–661.
- Samie, M.A., and Xu, H. (2014). Lysosomal exocytosis and lipid storage disorders. *J. Lipid Res.* 55, 995–1009.
- Sandhoff, K. (2012). My journey into the world of sphingolipids and sphingolipidoses. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* 88, 554–582.
- Sandhoff, K. (2016). Neuronal sphingolipidoses: Membrane lipids and sphingolipid activator proteins regulate lysosomal sphingolipid catabolism. *Biochimie* 130, 146–151.
- Sandhoff, K., and Harzer, K. (2013). Gangliosides and gangliosidoses: principles of molecular and metabolic pathogenesis. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 33, 10195–10208.
- Sano, R., Annunziata, I., Patterson, A., Moshiach, S., Gomero, E., Opferman, J., Forte, M., and d'Azzo, A. (2009). GM1-ganglioside accumulation at the mitochondria-associated ER membranes links ER stress to Ca(2+)-dependent mitochondrial apoptosis. *Mol. Cell* 36, 500–511.
- Sardiello, M., Palmieri, M., di Ronza, A., Medina, D.L., Valenza, M., Gennarino, V.A., Di Malta, C., Donaudy, F., Embrione, V., Polishchuk, R.S., et al. (2009). A gene network regulating lysosomal biogenesis and function. *Science* 325, 473–477.
- Sarig, O., Goldsher, D., Nousbeck, J., Fuchs-Telem, D., Cohen-Katsenelson, K., Iancu, T.C., Manov, I., Saada, A., Sprecher, E., and Mandel, H. (2013). Infantile mitochondrial hepatopathy is a cardinal feature of MEGDEL syndrome (3-methylglutaconic aciduria type IV with sensorineural deafness, encephalopathy and Leigh-like syndrome) caused by novel mutations in SERAC1. *Am. J. Med. Genet. A.* 161A, 2204–2215.
- Schnaar, R.L. (2010). Brain gangliosides in axon-myelin stability and axon regeneration. *FEBS Lett.* 584, 1741–1747.
- Schneider, J.L., and Cuervo, A.M. (2013). Chaperone-mediated autophagy: dedicated saviour and unfortunate victim in the neurodegeneration arena. *Biochem. Soc. Trans.* 41, 1483–1488.
- Schüle, R., Siddique, T., Deng, H.-X., Yang, Y., Donkervoort, S., Hansson, M., Madrid, R.E., Siddique, N., Schöls, L., and Björkhem, I. (2010). Marked accumulation of 27-hydroxycholesterol in SPG5 patients with hereditary spastic paresis. *J. Lipid Res.* 51, 819–823.
- Schulze, R.J., Weller, S.G., Schroeder, B., Krueger, E.W., Chi, S., Casey, C.A., and McNiven, M.A. (2013). Lipid droplet breakdown requires dynamin 2 for vesiculation of autolysosomal tubules in hepatocytes. *J. Cell Biol.* 203, 315–326.
- Sepulveda, F.E., Burgess, A., Heiligenstein, X., Goudin, N., Ménager, M.M., Romao, M., Côte, M., Mahlaoui, N., Fischer, A., Raposo, G., et al. (2015). LYST controls the biogenesis of the endosomal compartment required for secretory lysosome function. *Traffic Cph. Den.* 16, 191–203.
- Settembre, C., Di Malta, C., Polito, V.A., Garcia Arencibia, M., Vetrini, F., Erdin, S., Erdin, S.U., Huynh, T., Medina, D., Colella, P., et al. (2011). TFEB links autophagy to lysosomal biogenesis. *Science* 332, 1429–1433.
- Settembre, C., Zoncu, R., Medina, D.L., Vetrini, F., Erdin, S., Erdin, S., Huynh, T., Ferron, M., Karsenty, G., Vellard, M.C., et al. (2012). A lysosome-to-nucleus signalling mechanism senses and regulates the lysosome via

mTOR and TFEB. *EMBO J.* 31, 1095–1108.

Shen, D., Wang, X., Li, X., Zhang, X., Yao, Z., Dibble, S., Dong, X., Yu, T., Lieberman, A.P., Showalter, H.D., et al. (2012). Lipid storage disorders block lysosomal trafficking by inhibiting a TRP channel and lysosomal calcium release. *Nat. Commun.* 3, 731.

Shiflett, S.L., Kaplan, J., and Ward, D.M. (2002). Chediak-Higashi Syndrome: a rare disorder of lysosomes and lysosome related organelles. *Pigment Cell Res.* 15, 251–257.

Słabicki, M., Theis, M., Krastev, D.B., Samsonov, S., Mundwiller, E., Junqueira, M., Paszkowski-Rogacz, M., Teyra, J., Heninger, A.-K., Poser, I., et al. (2010). A Genome-Scale DNA Repair RNAi Screen Identifies SPG48 as a Novel Gene Associated with Hereditary Spastic Paraplegia. *PLoS Biol.* 8, e1000408.

Sleat, D.E., Wiseman, J.A., El-Banna, M., Price, S.M., Verot, L., Shen, M.M., Tint, G.S., Vanier, M.T., Walkley, S.U., and Lobel, P. (2004). Genetic evidence for nonredundant functional cooperativity between NPC1 and NPC2 in lipid transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 5886–5891.

Smyth, J.T., Hwang, S.-Y., Tomita, T., DeHaven, W.I., Mercer, J.C., and Putney, J.W. (2010). Activation and regulation of store-operated calcium entry. *J. Cell. Mol. Med.* 14, 2337–2349.

Soboloff, J., Rothberg, B.S., Madesh, M., and Gill, D.L. (2012). STIM proteins: dynamic calcium signal transducers. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 549–565.

Son, S.M., Jung, E.S., Shin, H.J., Byun, J., and Mook-Jung, I. (2012). A $\beta$ -induced formation of autophagosomes is mediated by RAGE-CaMKK $\beta$ -AMPK signaling. *Neurobiol. Aging* 33, 1006.e11-23.

de Souza, P.V.S., de Rezende Pinto, W.B.V., de Rezende Batistella, G.N., Bortholin, T., and Oliveira, A.S.B. (2017). Hereditary Spastic Paraplegia: Clinical and Genetic Hallmarks. *Cerebellum Lond. Engl.* 16, 525–551.

Soyombo, A.A., Tjon-Kon-Sang, S., Rbaibi, Y., Bashllari, E., Bisceglia, J., Muallem, S., and Kiselyov, K. (2006). TRP-ML1 regulates lysosomal pH and acidic lysosomal lipid hydrolytic activity. *J. Biol. Chem.* 281, 7294–7301.

Spillantini, M.G., Crowther, R.A., Jakes, R., Hasegawa, M., and Goedert, M. (1998). alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with lewy bodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 6469–6473.

Sridhar, S., Patel, B., Aphkhasava, D., Macian, F., Santambrogio, L., Shields, D., and Cuervo, A.M. (2013). The lipid kinase PI4KIII $\beta$  preserves lysosomal identity. *EMBO J.* 32, 324–339.

Stanishneva-Konovalova, T.B., Derkacheva, N.I., Polevova, S.V., and Sokolova, O.S. (2016). The Role of BAR Domain Proteins in the Regulation of Membrane Dynamics. *Acta Naturae* 8, 60–69.

Stevanin, G., Montagna, G., Azzedine, H., Valente, E.M., Durr, A., Scarano, V., Bouslam, N., Cassandrini, D., Denora, P.S., Criscuolo, C., et al. (2006). Spastic paraplegia with thin corpus callosum: description of 20 new families, refinement of the SPG11 locus, candidate gene analysis and evidence of genetic heterogeneity. *Neurogenetics* 7, 149–156.

Stevanin, G., Santorelli, F.M., Azzedine, H., Coutinho, P., Chomilier, J., Denora, P.S., Martin, E., Ouvrard-Hernandez, A.-M., Tessa, A., Bouslam, N., et al. (2007). Mutations in SPG11, encoding spatacsin, are a major cause of spastic paraplegia with thin corpus callosum. *Nat. Genet.* 39, 366–372.

Stevanin, G., Azzedine, H., Denora, P., Boukhris, A., Tazir, M., Lossos, A., Rosa, A.L., Lerer, I., Hamri, A., Alegria, P., et al. (2008). Mutations in SPG11 are frequent in autosomal recessive spastic paraplegia with thin corpus callosum, cognitive decline and lower motor neuron degeneration. *Brain J. Neurol.* 131, 772–784.

Stirnemann, J., Belmatoug, N., Camou, F., Serratrice, C., Froissart, R., Caillaud, C., Levade, T., Astudillo, L., Serratrice, J., Brassier, A., et al. (2017). A Review of Gaucher Disease Pathophysiology, Clinical Presentation and Treatments. *Int. J. Mol. Sci.* 18.

Styrt, B., Pollack, C.R., and Klempner, M.S. (1988). An abnormal calcium uptake pump in Chediak-Higashi neutrophil lysosomes. *J. Leukoc. Biol.* 44, 130–135.

Sugiura, Y., Shimma, S., Konishi, Y., Yamada, M.K., and Setou, M. (2008). Imaging mass spectrometry technology and application on ganglioside study; visualization of age-dependent accumulation of C20-ganglioside molecular species in the mouse hippocampus. *PLoS One* 3, e3232.

Sun, M., Goldin, E., Stahl, S., Falardeau, J.L., Kennedy, J.C., Jr, A., S, J., Bove, C., Kaneski, C.R., Nagle, J., et al. (2000). Mucoylipidosis type IV is caused by mutations in a gene encoding a novel transient receptor potential channel. *Hum. Mol. Genet.* 9, 2471–2478.

- Synofzik, M., and Schüle, R. (2017). Overcoming the divide between ataxias and spastic paraplegias: Shared phenotypes, genes, and pathways. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* *32*, 332–345.
- Takei, K., Slepnev, V.I., Haucke, V., and De Camilli, P. (1999). Functional partnership between amphiphysin and dynamin in clathrin-mediated endocytosis. *Nat. Cell Biol.* *1*, 33–39.
- Tasset, I., and Cuervo, A.M. (2016). Role of chaperone-mediated autophagy in metabolism. *FEBS J.* *283*, 2403–2413.
- Taylor, C.W., Tovey, S.C., Rossi, A.M., Lopez Sanjurjo, C.I., Prole, D.L., and Rahman, T. (2014). Structural organization of signalling to and from IP3 receptors. *Biochem. Soc. Trans.* *42*, 63–70.
- Tesson, C., Nawara, M., Salih, M.A.M., Rossignol, R., Zaki, M.S., Al Balwi, M., Schule, R., Mignot, C., Obre, E., Bouhouche, A., et al. (2012). Alteration of fatty-acid-metabolizing enzymes affects mitochondrial form and function in hereditary spastic paraplegia. *Am. J. Hum. Genet.* *91*, 1051–1064.
- Tesson, C., Koht, J., and Stevanin, G. (2015). Delving into the complexity of hereditary spastic paraplegias: how unexpected phenotypes and inheritance modes are revolutionizing their nosology. *Hum. Genet.* *134*, 511–538.
- Trilck, M., Peter, F., Zheng, C., Frank, M., Dobrenis, K., Mascher, H., Rolfs, A., and Frech, M.J. (2017). Diversity of glycosphingolipid GM2 and cholesterol accumulation in NPC1 patient-specific iPSC-derived neurons. *Brain Res.* *1657*, 52–61.
- Usui, M., Miyauchi, A., Nakano, Y., Nakamura, S., Jimbo, E., Itamura, S., Adachi, K., Nanba, E., Narita, A., Yamagata, T., et al. (2017). Miglustat therapy in a case of early-infantile Niemann-Pick type C. *Brain Dev.* *39*, 886–890.
- Usui-Aoki, K., Nakano, Y., and Yamamoto, D. (2002). Pathology of the adult central nervous system induced by genetic inhibition of programmed cell death in *Drosophila* pupae. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* *49*, 94–101.
- Vallat, J.-M., Goizet, C., Tazir, M., Couratier, P., Magy, L., and Mathis, S. (2016). Classifications of neurogenetic diseases: An increasingly complex problem. *Rev. Neurol. (Paris)* *172*, 339–349.
- Vanier, M.T. (2010). Niemann-Pick disease type C. *Orphanet J. Rare Dis.* *5*, 16.
- Varga, R.-E., Khundadze, M., Damme, M., Nietzsche, S., Hoffmann, B., Stauber, T., Koch, N., Hennings, J.C., Franzka, P., Huebner, A.K., et al. (2015). In Vivo Evidence for Lysosome Depletion and Impaired Autophagic Clearance in Hereditary Spastic Paraplegia Type SPG11. *PLoS Genet.* *11*, e1005454.
- Verkhatsky, A. (2005). Physiology and Pathophysiology of the Calcium Store in the Endoplasmic Reticulum of Neurons. *Physiol. Rev.* *85*, 201–279.
- Vitner, E.B., Platt, F.M., and Futerman, A.H. (2010). Common and uncommon pathogenic cascades in lysosomal storage diseases. *J. Biol. Chem.* *285*, 20423–20427.
- Vives-Bauza, C., Zhou, C., Huang, Y., Cui, M., de Vries, R.L.A., Kim, J., May, J., Tocilescu, M.A., Liu, W., Ko, H.S., et al. (2010). PINK1-dependent recruitment of Parkin to mitochondria in mitophagy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 378–383.
- te Vrugte, D., Jeans, A., Platt, F.M., and Sillence, D.J. (2010). Glycosphingolipid storage leads to the enhanced degradation of the B cell receptor in Sandhoff disease mice. *J. Inher. Metab. Dis.* *33*, 261–270.
- Wakabayashi, T. (2015). Mechanism of the calcium-regulation of muscle contraction--in pursuit of its structural basis. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* *91*, 321–350.
- Walkley, S.U., and Vanier, M.T. (2009a). Secondary lipid accumulation in lysosomal disease. *Biochim. Biophys. Acta* *1793*, 726–736.
- Walkley, S.U., and Vanier, M.T. (2009b). Pathomechanisms in Lysosomal Storage Disorders. *Biochim. Biophys. Acta* *1793*, 726–736.
- Walkley, S.U., Siegel, D.A., and Dobrenis, K. (1995). GM2 ganglioside and pyramidal neuron dendritogenesis. *Neurochem. Res.* *20*, 1287–1299.
- Walkley, S.U., Thrall, M.A., Haskins, M.E., Mitchell, T.W., Wenger, D.A., Brown, D.E., Dial, S., and Seim, H. (2005). Abnormal neuronal metabolism and storage in mucopolysaccharidosis type VI (Maroteaux-Lamy) disease. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* *31*, 536–544.
- Wang, H., Wang, A., Wang, D., Bright, A., Sency, V., Zhou, A., and Xin, B. (2016). Early growth and development impairments in patients with ganglioside GM3 synthase deficiency. *Clin. Genet.* *89*, 625–629.

- Wang, X., Zhang, X., Dong, X.-P., Samie, M., Li, X., Cheng, X., Goschka, A., Shen, D., Zhou, Y., Harlow, J., et al. (2012). TPC proteins are phosphoinositide- activated sodium-selective ion channels in endosomes and lysosomes. *Cell* *151*, 372–383.
- Wilhelm, L.P., Wendling, C., Védie, B., Kobayashi, T., Chenard, M.-P., Tomasetto, C., Drin, G., and Alpy, F. (2017). STARD3 mediates endoplasmic reticulum-to-endosome cholesterol transport at membrane contact sites. *EMBO J.* *36*, 1412–1433.
- Wu, T., Shi, Z., and Baumgart, T. (2014). Mutations in BIN1 associated with centronuclear myopathy disrupt membrane remodeling by affecting protein density and oligomerization. *PLoS One* *9*, e93060.
- Xie, C., Burns, D.K., Turley, S.D., and Dietschy, J.M. (2000). Cholesterol is sequestered in the brains of mice with Niemann-Pick type C disease but turnover is increased. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *59*, 1106–1117.
- Xu, H., and Ren, D. (2015). Lysosomal physiology. *Annu. Rev. Physiol.* *77*, 57–80.
- Xu, X., Zhang, A., Halquist, M.S., Yuan, X., Henderson, S.C., Dewey, W.L., Li, P., Li, N., and Zhang, F. (2017). Simvastatin promotes NPC1-mediated free cholesterol efflux from lysosomes through CYP7A1/LXR $\alpha$  signalling pathway in oxLDL-loaded macrophages. *J. Cell. Mol. Med.* *21*, 364–374.
- Xu, Y.-H., Barnes, S., Sun, Y., and Grabowski, G.A. (2010). Multi-system disorders of glycosphingolipid and ganglioside metabolism. *J. Lipid Res.* *51*, 1643–1675.
- Yoshikawa, M., Go, S., Takasaki, K., Kakazu, Y., Ohashi, M., Nagafuku, M., Kabayama, K., Sekimoto, J., Suzuki, S., Takaiwa, K., et al. (2009). Mice lacking ganglioside GM3 synthase exhibit complete hearing loss due to selective degeneration of the organ of Corti. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *106*, 9483–9488.
- Yu, L., McPhee, C.K., Zheng, L., Mardones, G.A., Rong, Y., Peng, J., Mi, N., Zhao, Y., Liu, Z., Wan, F., et al. (2010). Termination of autophagy and reformation of lysosomes regulated by mTOR. *Nature* *465*, 942–946.
- Yu, T., Shakkottai, V.G., Chung, C., and Lieberman, A.P. (2011). Temporal and cell-specific deletion establishes that neuronal Npc1 deficiency is sufficient to mediate neurodegeneration. *Hum. Mol. Genet.* *20*, 4440–4451.
- Yue, H.-Y., and Xu, J. (2015). Cholesterol regulates multiple forms of vesicle endocytosis at a mammalian central synapse. *J. Neurochem.* *134*, 247–260.
- Yue, Z., Friedman, L., Komatsu, M., and Tanaka, K. (2009). The cellular pathways of neuronal autophagy and their implication in neurodegenerative diseases. *Biochim. Biophys. Acta* *1793*, 1496–1507.
- Zervas, M., Dobrenis, K., and Walkley, S.U. (2001). Neurons in Niemann-Pick disease type C accumulate gangliosides as well as unesterified cholesterol and undergo dendritic and axonal alterations. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *60*, 49–64.
- Zhang, J., and Liu, Q. (2015). Cholesterol metabolism and homeostasis in the brain. *Protein Cell* *6*, 254–264.
- Zhang, J., Zhou, W., Lin, J., Wei, P., Zhang, Y., Jin, P., Chen, M., Man, N., and Wen, L. (2016). Autophagic lysosomal reformation depends on mTOR reactivation in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced autophagy. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *70*, 76–81.
- Zhou, S., Davidson, C., McGlynn, R., Stephney, G., Dobrenis, K., Vanier, M.T., and Walkley, S.U. (2011). Endosomal/Lysosomal Processing of Gangliosides Affects Neuronal Cholesterol Sequestration in Niemann-Pick Disease Type C. *Am. J. Pathol.* *179*, 890–902.
- Zou, J., Hu, B., Arpag, S., Yan, Q., Hamilton, A., Zeng, Y.-S., Vanoye, C.G., and Li, J. (2015). Reactivation of Lysosomal Ca<sup>2+</sup> Efflux Rescues Abnormal Lysosomal Storage in FIG4-Deficient Cells. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *35*, 6801–6812.

## Résumé :

Des dysfonctions du système lysosomal participent à un grand nombre de pathologies neurodégénératives soulignant l'importance des lysosomes dans la survie et la fonction des cellules du système nerveux central et en particulier des neurones. Le mécanisme de la reformation des lysosomes à partir d'organites hybrides comme les autolysosomes est crucial pour maintenir une quantité adéquate de lysosomes fonctionnels dans les cellules. La perturbation de ce processus est d'ailleurs impliquée dans plusieurs pathologies qui affectent le système nerveux central. Par exemple la spatacsine, qui joue un rôle dans ce mécanisme est impliquée dans la paraplégie spastique de type SPG11 est une maladie caractérisée par l'apparition de troubles moteurs et cognitifs sévères. Cette pathologie est causée par des mutations perte de fonction du gène *SPG11* qui code pour la spatacsine. L'utilisation de modèles cellulaires de cette pathologie offre l'opportunité d'étudier les mécanismes physiopathologiques à l'origine d'altérations de la reformation des lysosomes.

Au cours de mes travaux j'ai montré que la perte de fonction de la spatacsine est responsable de l'accumulation précoce de lipides dans les lysosomes de fibroblastes et de neurones en culture. Ces accumulations sont constituées de gangliosides et de cholestérol et sont présentes dans les autolysosomes perturbant leur recyclage en lysosomes, notamment en empêchant le recrutement de protéines impliquées dans le mécanisme. Les accumulations de gangliosides et la perturbation de la reformation des lysosomes qui en résulte rendent les neurones plus sensibles à des stress comme à l'exposition au glutamate ce qui suggère que ces altérations pourraient avoir un rôle dans la neurodégénérescence. Ces résultats pourraient alors être importants pour un grand nombre de maladies dans lesquelles des gangliosides s'accumulent dans le système lysosomal.

J'ai aussi montré que l'absence de spatacsine provoque une dérégulation de l'import de  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire par le « store-operated calcium entry » ce qui conduit à une augmentation de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cytosol. Les lysosomes des cellules *Spg11*<sup>-/-</sup> contiennent aussi plus de calcium et sa libération par le canal TRPML1 est réduite. L'inhibition de l'import de calcium par le SOCE et la stimulation du canal TRPML1 permettent de réduire les accumulations de lipides et de rétablir partiellement le recyclage des lysosomes.

Ces données suggèrent que l'absence de spatacsine induit une altération de l'homéostasie calcique qui participe à l'accumulation de lipides dans le système lysosomal et qui perturbe le processus de reformation des lysosomes ce qui est délétère pour la survie des neurones. Même si des approches thérapeutiques se dégagent à plusieurs niveaux de cette chaîne d'événements, comprendre comment la perte de fonction de la spatacsine perturbe ces fonctions en amont permettra de mieux cibler l'approche thérapeutique.

Mots-clés : Lysosome, Autolysosome, Reformation des lysosomes, Gangliosides, Cholestérol, Store-Operated Calcium entry (SOCE), Maladies neurodégénératives, Spatacsine.

## Abstract:

Lysosomal dysfunctions are involved in a large number of neurodegenerative diseases highlighting the crucial function of lysosomes in neuron survival and function. The mechanism of lysosome reformation from autolysosomes allow cells to maintain the pool of functional lysosomes. Disruptions of this process are involved in pathologies affecting the central nervous system. In particular, spatacsin that plays a role in lysosome recycling is implicated in hereditary spastic paraplegia type SPG11, a severe disease characterized by motors and cognitive alterations. This pathology is caused by loss of function mutations in *SPG11*, encoding spatacsin. The study of SPG11 cellular models gives the opportunity to decipher the physiopathological mechanisms underlying lysosomal reformation disruptions.

During my thesis, I showed that loss of spatacsin function induces lipid accumulation in lysosomes and particularly in autolysosomes both in fibroblasts and neurons from *Spg11*<sup>-/-</sup> mice. Gangliosides and cholesterol are among lipids that accumulate in autolysosomes impairing lysosomal membrane recycling by disrupting the recruitment of keys proteins. Neurons with ganglioside accumulations are more sensitive to glutamate induced neuronal death, suggesting that these accumulations are involved in neurodegeneration. These results could be of great importance since accumulations of gangliosides in lysosomes arise in many diseases.

I also showed that loss of spatacsin disrupts extracellular calcium import by the store-operated calcium entry (SOCE) leading to an increase in cytosolic calcium levels. Lysosomal calcium content is also increased in *Spg11*<sup>-/-</sup> cells and calcium release from lysosome by TRPML1 is reduced. Inhibiting SOCE and stimulating lysosomal calcium release by TRPML1 reduced lipids accumulations in lysosomes and partially restored lysosome reformation.

Our data suggest that absence of spatacsin is responsible for a disruption of calcium homeostasis that contributes to lipid accumulation in autolysosomes, disturbing reformation of lysosomes from autolysosomes. Inhibiting gangliosides synthesis could be used as a therapeutic strategy. However, understanding how loss of function of spatacsin alters these cellular pathways will allow the development of targeted therapeutic approaches.

Key words: Lysosome, Autolysosome, Autophagic lysosome reformation (ALR), Gangliosides, Cholesterol, Store-operated calcium entry (SOCE), Neurodegenerative diseases, Spatacsin