



HAL
open science

Rôle de la spastin dans le développement des circuits moteurs et leur dégénérescence dans les paraplégies spastiques héréditaires

Nicolas Jardin

► **To cite this version:**

Nicolas Jardin. Rôle de la spastin dans le développement des circuits moteurs et leur dégénérescence dans les paraplégies spastiques héréditaires. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2016. Français. NNT : 2016PA066601 . tel-01885505v1

HAL Id: tel-01885505

<https://theses.hal.science/tel-01885505v1>

Submitted on 2 Oct 2018 (v1), last revised 24 Sep 2019 (v2)

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.

**THESE DE DOCTORAT DE
L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE**

Spécialité Neurosciences

Ecole Doctorale 158 – Cerveau, Cognition, Comportement

Présentée par

M. Nicolas JARDIN

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

Sujet de la thèse :

**ROLE DE LA SPASTIN DANS LE DEVELOPPEMENT DES CIRCUITS MOTEURS ET LEUR
DEGENERESCENCE DANS LES PARAPLEGIES SPASTIQUES HEREDITAIRES**

soutenue le 30 septembre 2016

devant le jury composé de :

Mme. Michèle STUDER, DR1 INSERM
M. Cyril GOIZET, PUPH

Rapporteur
Rapporteur

Mme. Corinne HOUART, Prof
Mme. Isabelle BRUNET, CR1 INSERM
Mme. Christine VESQUE, CR1 INSERM

Examinateur
Examinateur
Examinateur

Mme. Jamilé HAZAN, DR2 CNRS
Mme. Coralie FASSIER, CR2 INSERM

Directeur de thèse
Co-Directeur de thèse

Remerciements

Au cours de ces cinq années passées sur le campus Jussieu, j'ai pu observer sa métamorphose progressive, et c'est avec une certaine satisfaction pour les coïncidences que je soutiens ma thèse le jour de son inauguration. Ces dernières années ont été pour moi une étape-clé de mon parcours scientifique et plus généralement de ma vie : j'en ressors transformé. Comme pour le campus Jussieu, mon « chantier » a été parfois chaotique, parfois laborieux, souvent épuisant mais il a été rondement mené par ces architectes et maîtres d'œuvre que je tiens à remercier du plus profond du cœur ! Mais avant de commencer, je tiens à remercier chaleureusement mon jury de thèse qui a accepté de venir « couper le ruban » de cette aventure. Merci à mes rapporteurs Michèle Studer et Cyril Goizet d'avoir évalué ce manuscrit. Je remercie également les membres examinateurs de ce jury, Corinne Houart, Isabelle Brunet et Christine Vesque. Je tiens enfin à remercier les membres de mon comité d'évaluation à mi-thèse Judith Melki et Estelle Hirsinger pour leurs conseils avisés.

C'est donc avec une grande émotion que je remercie les deux architectes de ce projet, Jamilé Hazan et Coralie Fassier. Pendant cinq ans vous avez veillé sur moi tout en me laissant prendre les responsabilités qui m'ont permis d'être celui que je suis aujourd'hui. Jamilé, je suis infiniment reconnaissant de la confiance que tu m'as accordée et ce, même suite à une période probatoire, disons, peu probante ! Grâce aux différents financements que tu as obtenus, j'ai été à l'abri de toute question financière pendant ma thèse, et je mesure la chance que j'ai eue dans ce contexte de disette. Tu n'as pas hésité un instant à me permettre de présenter mes travaux dans des congrès internationaux. J'ai beaucoup appris avec toi et je suis ravi d'avoir apporté ma pierre à cet édifice dont tu as posé les fondations. Coralie, je ne pourrai jamais assez te remercier pour l'énergie que tu as mise dans le bon déroulement de ma thèse. Tu as su très habilement canaliser mes idées tout en laissant s'exprimer ma tête de mule et en te tenant prête à remonter le moral d'un thésard déprimé par ses choix pas toujours judicieux. Mais par dessus tout, tu m'as appris aussi bien d'un point de vue technique que d'un point de vue scientifique à théoriser, (micro)manipuler, analyser, interpréter et retranscrire. Autant dire que je te dois énormément et que la suite de ma carrière reposera beaucoup sur ce que tu m'as transmis !

Ensuite je remercie les membres de cette équipe qui est également « sortie de terre » durant ces cinq ans. Daniel, tu as toujours été là pour me guider et me remonter le moral quand ça n'allait pas. Tu as essuyé tous les plâtres, j'ai pu appréhender ma thèse d'une manière bien plus calme que je ne l'aurais fait si tu n'avais pas été là. De même, je n'aurais jamais connu autant de monde dans ce laboratoire si tu ne me les avais pas présentés ! Merci pour ces soirées mémorables, ces discussions foisonnantes au labo, ces déménagements animés et tout ce que nous avons partagé ensemble. Tu as vraiment mis le premier coup de pelle de ce chantier ! Notre équipe s'est ensuite agrandie avec l'arrivée de Laïla et Mélody. Avec vous, les projets ont pris une nouvelle dimension et se sont diversifiés. Laïla, tu as beaucoup veillé sur moi et nos discussions intéressantes ont été des bulles d'air toujours bienvenues ! J'ai été très heureux de partager ce coin de bureau avec toi ! Mélody, j'espère avoir été autant disponible pour toi qu'a pu l'être Daniel pour moi. Tu as su passer outre mon caractère réservé pour chercher à savoir si j'allais bien. Merci pour ton soutien sans faille ! Je te souhaite une excellente suite et fin de thèse : je suis sûr que ça sera une belle récolte d'ici peu, tu le mérites ! Enfin Anaïs, qui rejoindra les rangs de cette équipe en thèse dès demain. Je te souhaite de t'épanouir le plus possible sur ton projet, et de passer une très bonne thèse !

En plus d'une équipe formidable, j'ai eu la chance d'être entouré par des gens uniques qui m'ont tous beaucoup apporté. Tout particulièrement, je tiens à remercier les équipes de François Couraud, Fatiha Nothias et Sylvie Schneider-Maunoury. Merci à Barbara, Erika, Christine et Amélie pour votre générosité que ce soit en matière de sourire, de soutien, de gâteaux voire de bière artisanale ! Amélie, je te remercie pour le calme que tu m'as apporté durant mes premières années de thèse. Je suis ravi de voir que tout se passe bien pour toi, et j'ai hâte de te suivre ton exemple pour la suite ! Un grand Merci à Fatiha pour sa bienveillance, son accueil dans son laboratoire avant la (longue) phase de travaux, toujours à venir prendre des nouvelles et à me remonter le moral dans les moments difficiles. Je remercie également Sylvia, Laetitia, Uz, Marie-Noëlle, Ulla, Jamila, Redouane, Sophie et Illona qui ont vraiment égayé mon quotidien de leur présence ! Je suis vraiment heureux d'avoir passé ma thèse avec toi Jamila, tu m'as toujours encouragé, et ta détermination chaque jour a été un véritable exemple pour moi. Je tiens à remercier mille fois l'équipe de Sylvie Schneider-Maunoury et tout particulièrement Sylvie, Christine, François, Marie, Alexis, Isabelle, Guillaume, Antoine et Ines.

Que ce soit en lab meeting, en se croisant à l'animalerie ou à la plateforme d'imagerie, vous m'avez tous toujours encouragés et soutenus. Merci à Christine de m'avoir fait l'honneur de participer à ce jury de thèse. Merci également à François et Marie qui m'ont prodigué de très nombreux conseils et m'ont sorti de plusieurs impasses techniques au cours de ces cinq années. Encore merci pour vos repas de Noël légendaires.

Je tiens aussi à remercier toutes les personnes de l'unité PMSNC transformée en NPS durant ce chantier ! Merci Fatima pour ta gentillesse au quotidien. Merci tout particulièrement à mes très chers voisins : Carlos qui a souvent trouvé les mots pour me calmer, et qui a eu la patience de m'apprendre à faire du roller après le labo, Arnaud qui a toujours été derrière moi et avec qui les discussions plus ou moins philosophiques sur tous les sujets qui nous passaient sous la main ont toujours été un régal, Anne-Charlotte qui a le don de la pause-café efficace qui remonterait même le moral d'un thésard et à Guillaume pour son énergie, je te souhaite plein de réussite ! Merci également à Marc, Marine, Maryam, Emma, Andry, Elias et Ashwin d'avoir été là avec le sourire et toujours le mot pour rire sous le coude. Merci enfin aux visiteurs réguliers dont les passages ont été des moments précieux : Monara, Abdallah, Fabrice, Frank, Odile, Stéphanie, Laurianne, Thomas, Alejandro, Victor, etc.

Merci à l'équipe de choc de gestionnaires avec qui j'ai eu le plaisir de travailler durant ces cinq ans et qui a toujours répondu présente à mes nombreuses demandes : Joanna, Caroline, Laetitia, Sonia, Catherine, Barbara, Sylvie et Vincent. Merci tout particulièrement à Joanna qui a vraiment été au petit soin pour moi.

Un grand Merci également à toute l'équipe de l'ancienne et de la nouvelle animalerie aquatique, autre grand projet auquel j'ai été ravi de participer durant ma thèse : Isabelle, Karim et toute l'équipe : Nicolas, Alex, Stéphane, Sylvie, Edouard et Florine.

Merci à toute l'équipe du Magistère Européen de Génétique pour m'avoir permis de m'épanouir et de me donner l'envie de poursuivre vers un doctorat. Merci tout particulièrement à Isabelle Caillé et Thierry Galli qui m'ont donné le goût des neurosciences et m'ont orienté vers ce laboratoire.

Merci à mes amis de tout temps et de tout lieu. Merci à Nicolas, Flavien, Sophie, Mathieu, Jacques et Maxime pour leur soutien et leur compréhension depuis les bancs du collège et du lycée. Vous avez toujours été là et je suis vraiment fier de vous avoir pour amis depuis tant d'années! Merci également à la fine équipe des éternels P1 et des Magistériens : Julien, Gregory, Léonard, Marion, Vinh-Nahm, Aurélien, Julie, Driss, Julien, Gautier, Léonard, etc. On s'est construit dans l'échec et dans la réussite, sans jamais rien lâcher, et ça n'est pas prêt de s'arrêter!

Ma famille, a peut-être toujours été là par définition : mais c'est bien plus que ça en réalité! Mes parents, mes frères, vous avez apporté les fondations de tout cet édifice, et cette thèse c'est aussi la vôtre! Grâce à vous, j'ai eu une enfance et une adolescence heureuse emplies de curiosité et de découverte débridées, tremplin idéal pour commencer une carrière de chercheur! Vous avez toujours fait passer mon intérêt avant le vôtre et mis en retrait vos réserves pour me laisser prendre confiance en moi. Absolument tout paraît surmontable quand on vous voit faire! J'espère être un aussi bon parent, en tout cas j'ai déjà l'exemple idéal grâce à vous. Je remercie aussi ma belle-famille, beaux-parents, belles-sœurs, beaux-frères et nièces, qui ont été patients avec moi et ont accepté avec le sourire la vie que nous avons choisi bien qu'elle soit loin de vous tous.

Enfin, je remercie ma chère et tendre, Karen, qui a été pour moi un soutien mais aussi un exemple, un objectif. Ta franchise sans faille, m'a guidé vers les meilleures décisions, même si j'ai souvent freiné des quatre fers! Dans ce monde où il est difficile de trouver sa place, je ne sais pas où je souhaite aller mais je sais que c'est avec toi que j'y vais.

Merci

Table des matières

I	INTRODUCTION	1
I	Les Paraplégies Spastiques Héritaires (PSH)	3
I	La motricité volontaire	3
I.A	Les voies motrices impliquées dans le contrôle de la motricité volontaire	4
I.A.1	Les voies pyramidales ou cortico-spinales	4
I.A.2	Les voies extrapyramidales	5
I.B	Pathologies associées aux lésions de la voie pyramidale	6
II	Paraplégies Spastiques Héritaires : des pathologies complexes à tous niveaux	6
II.A	Caractéristiques cliniques des PSH	7
II.A.1	Prévalence et variations géographiques	7
II.A.2	Symptomatologie des PSH	8
II.B	Une importante variabilité clinique	8
II.B.1	Classification clinique des PSH : formes pures et formes complexes	9
II.B.2	Âge d'apparition et progressivité des symptômes	9
II.B.3	La sévérité des symptômes	11
II.C	Neuropathologie	12
II.C.1	Anatomopathologie des PSH	12
II.C.2	Une expressivité clinique surprenante	16
II.D	Diagnostic clinique	16
II.E	Approche thérapeutique	17
III	Un nombre grandissant de formes génétiques pour toujours plus de complexité	18

TABLE DES MATIÈRES

III.A Formes Sporadiques et Familiales	18
III.B La génétique des formes familiales	19
III.C Un déséquilibre du sex-ratio assez général	20
III.D Un manque de corrélation Génotype/Phénotype	21
IV Diversité des mécanismes pathogéniques	23
IV.A Processus cellulaires défectueux	25
IV.A.1 Altération du trafic endo-lysosomal	25
IV.A.2 Défaut de morphogénèse du réticulum endoplasmique	31
IV.A.3 Altération du métabolisme lipidique	33
IV.A.4 Altération du transport axonal	35
IV.A.5 Dysfonctionnement mitochondrial	39
IV.A.6 Altération de la gaine de myéline	41
IV.A.7 Défaut de guidage axonal	42
IV.B Dérégulation de voies de signalisation	43
IV.B.1 La signalisation des BMPs	43
IV.B.1.a Présentation générale	43
IV.B.1.b Rôle de la signalisation des BMPs dans l'établissement et la maintenance des circuits moteurs	47
IV.B.1.c Les protéines de PSH dans la régulation de la signalisation des BMPs	49
IV.B.2 La voie de signalisation semaphorin/neuropilin-1	51
IV.B.2.a La signalisation	51
IV.B.2.b Implication de la signalisation Sema3A/neuropilin-1 dans la pathogénèse des PSH	53
IV.B.3 Autres voies de signalisation ?	54
II Les PSH liées au gène <i>SPG4</i>	57
I Présentation clinique	57
I.A Hétérogénéité clinique	57

I.B	Neuropathologie	58
II	Présentation du gène codant la spastin	59
II.A	Le locus <i>SPG4</i>	59
II.A.1	Epissage alternatif du transcrit <i>SPG4</i>	61
II.A.2	Patron d'expression du gène <i>SPG4</i>	62
II.B	Un spectre de mutations très vaste	62
II.B.1	Les mutations ponctuelles	63
II.B.2	Les CNVs ou variations du nombre de copies	65
II.B.3	Polymorphismes et modificateurs intragéniques	67
II.B.4	Corrélation génotype/phénotype	68
II.B.5	Mécanismes Pathogéniques	69
III	La protéine codée par <i>SPG4</i>	71
III.A	Ses différents domaines structuraux	72
III.B	Structure quaternaire de la spastin	73
III.C	La spastin, une enzyme de cassure des microtubules appartenant au groupe méiotique des AAA	75
III.C.1	La sous-famille méiotique	77
III.C.2	Rôle des différents membres de cette sous-famille	78
III.C.2.a	Vps4, un membre à part	78
III.C.2.b	Les enzymes de cassure des microtubules	78
III.C.2.b.i	La p60-katanin et ses paralogues	81
III.C.2.b.ii	La fidgetin et ses paralogues	82
IV	Les isoformes de spastin	83
IV.A	Patron d'expression de la spastin	86
IV.B	Une localisation subcellulaire complexe	89
IV.B.1	Localisation subcellulaire de la spastin dans les cellules mitotiques	89
IV.B.2	Localisation subcellulaire de la spastin dans les cellules neuronales	91
IV.C	Des partenaires particuliers	92

TABLE DES MATIÈRES

IV.D Des fonctions cellulaires diverses	95
IV.D.1 La cassure des microtubules : une activité à l'origine de toutes les fonctions de la spastin	95
IV.D.1.a Evidences <i>in vitro</i>	95
IV.D.1.b Evidences <i>in vivo</i>	98
IV.D.2 Remodelage et trafic membranaire	101
IV.D.2.a Trafic endosomal	101
IV.D.2.b Remodelage du Réticulum Endoplasmique	103
IV.D.2.c Homéostasie des gouttelettes lipidiques	104
IV.D.2.d Cytodiérèse et reformation de l'enveloppe nucléaire	105
IV.D.3 Fonction nucléaire : la spastin, un facteur de transcription ?	106
V Les différents modèles d'étude	106
V.A Les modèles <i>SPG4</i> de drosophile	106
V.B Le modèle poisson-zèbre <i>SPG4</i>	108
V.C Les modèles murins <i>SPG4</i>	109
V.D Les cellules iPSC de patients	110
III OBJECTIFS DE LA THÈSE	113
II RÉSULTATS	119
A key role for p60-Katanin in motor axon targeting is conditioned by tubulin polyglutamylase TTLL6	121
Dysregulation of key developmental signalling pathways in <i>SPG4</i>-linked spastic paraplegia	163

III DISCUSSION	209
I Y a t-il une redondance fonctionnelle entre la spastin et la p60-katanin ?	211
II Un rôle différentiel pour les deux isoformes majoritaires de la spastin	216
III L'isoforme courte en tant qu'effecteur de la signalisation	
Semaphorin/Neuropilin-1	221
IV La voie des Bone Morphogenetic Proteins (BMP) dans la pathogénèse des PSH	225
Bibliographie	235

TABLE DES MATIÈRES

Table des figures

Figure 1	Représentation schématique des voies motrices, du cortex au muscle	5
Figure 2	Distribution de l'âge d'apparition des symptômes sur 608 patients atteints de PSH	10
Figure 3	Corrélation entre le score SPRS (ordonnée) et la classification en 4 degrés du handicap (abscisse) basée sur 63 patients provenant de 50 familles	12
Figure 4	Atteinte des faisceaux moteurs et sensoriels dans les PSH	13
Figure 5	Données épidémiologiques provenant du réseau italien de PSH (1707 sujets) . .	19
Figure 6	Diagnostic clinique et génétique des formes de PSH	22
Figure 7	Spécificité de certains phénotypes parmi les formes les plus fréquentes de PSH	22
Figure 8	Appréciation globale du chevauchement génétique et clinique entre les PSH et d'autres maladies neurodégénératives	23
Figure 9	Vue d'ensemble des différents mécanismes pathogéniques à l'origine des PSH .	25
Figure 10	Représentation schématique du trafic endo-lysosomal	26
Figure 11	Mécanisme de fission des endosomes	28
Figure 12	Spastin, atlastin-1, REEP1-4 et reticulum interagissent au sein du Réticulum Endoplasmique (RE)	32
Figure 13	Les moteurs moléculaires	36
Figure 14	Les dilatations axonales des souris <i>knockout SPG2</i> , <i>SPG4</i> et <i>SPG7</i>	39
Figure 15	Défauts mitochondriaux des souris <i>knockout SPG7</i>	40
Figure 16	Voie canonique de la signalisation BMP	45
Figure 17	Voie non-canonique de la signalisation des BMPs	46
Figure 18	Implication de la voie des BMPs dans diverses pathologies humaines	47

TABLE DES FIGURES

Figure 19	Représentation schématique des voies en aval de la signalisation de Sema3A et de leurs conséquences au niveau cellulaire	52
Figure 20	Organisation génomique du gène <i>SPG4</i> en 17 exons et séquences de leurs sites accepteurs et donneurs d'épissage	60
Figure 21	Epissage alternatif de l'exon 4 du gène <i>Spg4</i> dans différents tissus murins	62
Figure 22	Distribution des mutations ponctuelles au sein de la séquence primaire de la spastin (plus de 200 mutations, mises à jour en 2009)	65
Figure 23	Représentation schématique du voisinage génomique du gène <i>SPG4</i> (aussi appelé <i>SPAST</i>).	66
Figure 24	Analyse du niveau d'expression de la spastin chez des patients <i>SPG4</i>	70
Figure 25	Représentation schématique de la structure primaire de la spastin et de ces différents motifs et domaines structurels	73
Figure 26	Représentations graphiques de la structure quaternaire de la spastin	74
Figure 27	Diversité fonctionnelle des protéines de la superfamille des AAA	76
Figure 28	La sous-famille méiotique des AAA	77
Figure 29	Modèle d'action de spastin, p60-katanin et fidgetin dans le mécanisme de "pacman-flux" lors de l'anaphase	80
Figure 30	Séquence peptidique de la spastin humaine (NP_055761) et représentation schématique de ses isoformes majoritaires	85
Figure 31	Enrichissement des isoformes M1 et M1 Δ ex4 dans le système nerveux	87
Figure 32	Alignement du contexte génétique des deux codons initiateurs de la traduction (ATG) de la spastin chez différentes espèces vertébrées	88
Figure 33	Schéma représentant le cadre ouvert de lecture en amont (uORF) de l'ORF <i>SPG4</i>	88
Figure 34	Localisation des isoformes de la spastin dans des cellules HeLa	90
Figure 35	La spastin est fortement enrichie dans les points de branchement et les cônes de croissance des neurones en culture	91
Figure 36	Représentation schématique des interactants de la spastin	93
Figure 37	La spastin casse les microtubules <i>in vitro</i>	96

Figure 38	La polyglutamylation régule l'activité de cassure de la spastin	97
Figure 39	La spastin régule la dynamique des microtubules <i>in vivo</i>	100
Figure 40	La spastin régule la fission des tubules endosomaux	102
Figure 41	La spastin M1 régule la taille et la distribution des gouttelettes lipidiques . . .	104
Figure 42	Quel est le rôle de la spastin et de la p60-katanin dans la mise en place des circuits neuronaux?	115
Figure 43	La spastin régule-t-elle la voie des BMP comme d'autres protéines de PSH? . .	117
Figure 44	Les activités de cassure des microtubules portées par la spastin et la p60-katanin ne semblent pas redondantes.	212
Figure 45	Contribution respective des modèles souris et poisson-zèbre à l'analyse des voies de signalisation dérégulées par les isoformes DrM1/M1 ou DrM61/M87 dans le développement et la dégénérescence des circuits moteurs.	220

Liste des tableaux

Tableau 1	Prévalences observées en Europe selon plusieurs publications rapportées par Ruano <i>et al.</i> 2014	7
Tableau 2	Littérature sur les cas de PSH avec un âge d'apparition précoce	10
Tableau 3	Mécanismes d'action des différentes molécules utilisées en traitement symptomatique	18
Tableau 4	Les 18 protéines de PSH impliquées dans le trafic endo-lysosomal	30
Tableau 5	Partenaires d'interaction de la spastin	94
Tableau 6	Présentation des différents modèles <i>SPG4</i> de drosophile et de leurs phénotypes	108
Tableau 7	Présentation des différents modèles murins associés au gène <i>SPG4</i> et de leurs phénotypes locomoteurs et neuropathologiques	110
Tableau 8	Présentation des différents modèles neuronaux différenciés à partir de cellules souches de patients <i>SPG4</i> ou d'individus contrôles ayant subi un <i>knockdown</i> de la spastin endogène	112

Liste des symboles

AAA	ATPase Associated with diverse cellular Activities
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADNc	Acide DésoxyriboNucléique
AP	Adaptor protein
ARL6IP1	ADP-Ribosylation-Like Factor 6-Interacting Protein 1
ARN	Acide RiboNucléique
ATG	codon initiateur de la traduction
ATG9	Autophagy-related protein 9
ATP	Adénosine-5'-TriPhosphate
BMP	Bone Morphogenetic Proteins
cdk	cyclin-dependent kinase
CMT	Charcot-Marie-Tooth
CNVs	Copy Nuber Variations/Variants
CO-SMAD	Common-mediator Smad
CRMP	Collapsin Response Mediator Protein
CYP2U1	Cytochrome P450 Family 2 Subfamily U
CYP7B1	Cytochrome P450 Family 7 Subfamily B Member 1
DTI	Diffusion Tensor Imaging
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	EGF Receptor
ERK	Extracellular Regulated kinases
ESCRT	Endosomal Sorting Complex Required for Transport
FA2H	Fatty Acid 2-Hydroxylase
FAK	Focal Adhesion Kinase

LISTE DES SYMBOLES

GABA	Gamma-AminoButyric Acid
GOF	Gain of Function
GPI	Glycosyl Phosphatidyl Inositol
GSK	Glycogen Synthase Kinase
GTP	Guanosine-5'-TriPhosphate
HbH	Hélice-boucle-Hélice
HD	Hairpin Domain
hESC	cellules souches embryonnaires humaines
HOXA10	Homeobox A10
HSP	Heparan Sulfate Proteoglycans
HSP60	Heat Shock Protein 60
I-SMAD	Inhibitors of Smad
iPSC	induced Pluripotent Stem Cells
IRM	Imagerie à Résonance Magnétique
JUNK	c-Jun N-terminal kinases
KHC	Chaines lourdes de kinesin
KIF	Kinesin Family member
KLC	Chaines légères de kinesin
KO	knockout
L1-CAM	L1 Cell Adhesion Molecule
LD	Lipid Droplets
LDL	Low Density Lipoprotein
LIMK1	LIM Domain Kinase 1
LOF	Loss of Function
LZ	leucine-zipper
m.m.i	membrane mitochondriale interne
MAP kinases	Mitogen-activated protein kinases
MAP1B	Microtubule Associated Protein 1B
MAPs	Microtubule Associated Proteins
MCT8	Monocarboxylate transporter 8
MIT	Microtubule-Interacting and Trafficking domain
MLPA	Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification

MSE	Microtubule-Severing Enzyme
MT-ATP6	mitochondrially encoded ATP synthase 6
MT-CO3	mitochondrially encoded cytochrome c oxidase III
MTBD	MicroTubule Binding Domain
MTs	Microtubules
NBIA	Neurodégénérescence avec Surcharge Cérébrale en Fer
NES	signal d'export nucléaire
NGF	Nerve Growth Factor
NIPA1	Non Imprinted In Prader-Willi/Angelman Syndrome 1
NLS	séquence de localisation nucléaire
NRP	neuropilin
NTE	Neuropathy Target Esterase
ONS	cellules souches de la muqueuse nasale
OP-1	Osteogenic Protein 1
ORF	Open Reading Frame
PCR	Polymerase Chain Reaction
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PLP	ProteoLipid Protein
PLS	Sclérose Latérale Primitive
PNPLA6	Patatin like phospholipase domain containing 6
PP1	Protein phosphatase 1
PPA2	pyrophosphatase (inorganic) 2
PSH	Paraplégies Spastiques Héritaires
PSH-AD	PSH Autosomique Dominante
PSH-AR	PSH Autosomique Récessive
PSH-X	PSH liée au chromosome X
R-SMAD	Receptor-regulated Smad
RAB3GAP2	RAB3 GTPase activating non-catalytic protein subunit 2
RE	Reticulum Endoplasmique
REEP1	Receptor Expression-Enhancing Protein 1
REL	Reticulum Endoplasmique Lisse
RER	Reticulum Endoplasmique Rugueux

LISTE DES SYMBOLES

RT-PCR	Reverse Transcriptase PCR
SACS	Spastic Ataxia Charlevoix-Saguenay
siRNA	small interfering RNA
SLA / ALS	Sclérose Latérale Amyotrophique
SMAD	SMA (small body size) + MAD (Mothers against decapentaplegic)
SNC	Système Nerveux Central
SPG	Spastic Paraplegia Gene
SPRS	Spastic Paraplegia Rating Scale
SRH	Second Region of Homology
SSNA1	Sjögren's Syndrome Nuclear Autoantigen 1
TAG	TriAcylGlycerol
TfR	Récepteurs à la transferrin
TGF	Transforming Growth Factor
TrkA	Tropomyosin receptor kinase A
TTLL	Tubulin Tyrosine Ligase Like
UTR	UnTranslated Region
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WASH	Wiskott-Aldrich Syndrome Protein and SCAR Homologue
ZFYVE26	Zinc Finger FYVE-Type Containing 26
γ -TuRC	γ -Tubulin Ring Complex

Première partie

INTRODUCTION

Chapitre I

Les Paraplégies Spastiques Héréditaires (PSH)

I La motricité volontaire

La motricité volontaire est portée par quatre régions distinctes, mais hautement interactives, des système nerveux central et périphérique : les voies motrices descendantes, les ganglions de la base, le cervelet et les circuits spinaux.

Chez les mammifères, les voies neurologiques contrôlant la motricité volontaire sont principalement assemblées en deux « étages » :

- un ensemble de faisceaux nerveux descendant, qui émane des neurones moteurs dits supérieurs, situés dans l'aire motrice du cortex cérébral, et dont les axones se connectent aux motoneurones et interneurones de la corne ventrale de la moelle épinière.
- puis, un deuxième « étage » de neurones moteurs, les motoneurones dits inférieurs, localisés au niveau de la corne ventrale de la moelle épinière et dont les axones innervent les muscles en établissant des synapses neuromusculaires (Reid, 2003; Soderblom and Blackstone, 2006).

I.A Les voies motrices impliquées dans le contrôle de la motricité volontaire

I.A.1 Les voies pyramidales ou cortico-spinales

Les faisceaux d'axones issus des neurones moteurs supérieurs forment les voies pyramidales ou cortico-spinales. Le tractus pyramidal représente une des voies principales du contrôle de la motricité volontaire chez l'homme et les primates. Les fibres constituant cette voie émanent de l'écorce cérébrale (substance grise du cerveau), et parcourent la moelle épinière sur toute sa longueur. Au cours de sa traversée du tronc cérébral, le faisceau pyramidal va se dissocier en aval du bulbe pour donner lieu à deux faisceaux. L'un, le plus important (constitué de 80% des fibres des neurones pyramidaux), est appelé **le faisceau pyramidal croisé ou faisceau cortico-spinal latéral** car les axones qui le constituent décussent, c'est-à-dire traversent la ligne médiane, à la hauteur du bulbe pour connecter l'hémisphère cérébral d'origine avec les motoneurones spinaux controlatéraux, de manière à assurer les commandes motrices des muscles controlatéraux (Figure 1). Le deuxième faisceau, est quant à lui nommé **faisceau pyramidal ventral ou direct** car il est constitué du faible contingent de fibres (20%) qui ne décussent pas au niveau de la ligne médiane et qui se projettent directement dans le cordon antérieur de la moelle épinière. Cependant, ce faisceau dit direct projette bilatéralement sur les motoneurones et interneurones de la moelle, et une partie des axones le constituant croisent la ligne médiane juste avant de contacter leurs cibles pour se connecter aux neurones innervant les muscles contralatéraux alors que d'autres fibres restent du côté ipsilatéral (Figure 1; Carpenter, 1991; Reid, 2003; Soderblom and Blackstone, 2006).

Les axones constituant la voie pyramidale sont exceptionnellement longs, certains d'entre eux faisant plus d'un mètre de longueur chez l'homme ou les grands singes, avec des volumes pouvant parfois excéder de cent fois celui du corps cellulaire. Bien que cette longueur confère un avantage quant à la transmission rapide du signal moteur avec un nombre de relais très réduit, elle engendre des coûts non négligeables pour le neurone. En effet, seule une machinerie intracellulaire complexe et performante permettra d'assurer la distribution des organites, protéines, lipides et autres molécules nécessaires à l'homéostasie du neurone sur de telles distances (Reid, 2003; Soderblom and Blackstone, 2006).

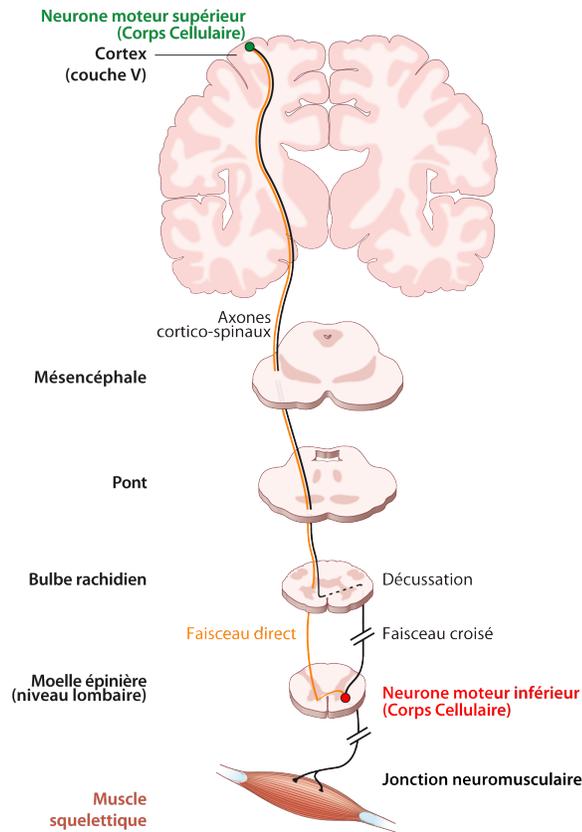


FIGURE 1 – **Représentation schématique des voies motrices, du cortex au muscle.** Le faisceau pyramidal est l'un des composants de ces voies responsable de la motricité volontaire. Les neurones moteurs supérieurs (corps cellulaire marqué en vert) se connectent via un faisceau direct (orange) ou croisé (noir) aux motoneurons dits inférieurs (corps cellulaire marqué en rouge) et aux interneurons de la moelle épinière. Ces derniers étendent leurs axones pour se connecter à leur tour aux muscles squelettiques. Modifié de Blackstone, 2012.

I.A.2 Les voies extrapyramidales

Bien que la voie pyramidale soit principalement responsable du contrôle de la motricité volontaire chez l'homme et les primates, d'autres voies apportent également une contribution capitale au contrôle de la motricité, et ce, de façon encore plus marquée chez les animaux à quatre pattes comme par exemple les rongeurs. Il s'agit des voies extrapyramidales qui ont été trouvées déterminantes à la motricité volontaire chez les rongeurs et les chats, ainsi que celles des faisceaux spino-cerebelleux et rubro-spinal, qui assurent le contrôle de la motricité par le cervelet et les noyaux gris centraux respectivement.

I.B Pathologies associées aux lésions de la voie pyramidale

Le faisceau cortico-spinal présente une importance clinique majeure. En effet, des lésions de ce tractus sont à l'origine d'un syndrome pyramidal, que l'on peut définir par la combinaison d'une spasticité (ou raideur) associée à une hypertonicité musculaire et à des réflexes ostéotendineux exagérés.

En fonction du niveau où se situe la lésion le long du tractus cortico-spinal, la paralysie va affecter les quatre membres (tétraparésie ou tétraplégie), les membres situés d'un même côté du corps (hémiparésie ou hémiplégie), ou encore les membres inférieurs uniquement (paraparésie ou paraplégie) et parfois même un seul membre (monoparésie ou monoplégie).

Les paralysies spastiques peuvent être le résultat d'une grande variété de lésions : scléroses en plaques, attaques cérébrales, lésions de la moelle épinière (Reid, 2003; Soderblom and Blackstone, 2006). Cependant, les paraplégies spastiques peuvent également avoir une origine génétique, on parle alors de Paraplégies Spastiques Héréditaires (PSH), des maladies monogéniques, génétiquement très hétérogènes et caractérisées par une dégénérescence des tractus cortico-spinaux (Reid, 2003).

II Paraplégies Spastiques Héréditaires : des pathologies complexes à tous niveaux

Bien qu'en 1876, Adolf Seeligmüller évoque un déficit héréditaire associant faiblesse et spasticité musculaire, les paraplégies spastiques héréditaires ont été décrites pour la première fois en 1880 par le neurologue allemand Adolf Strümpell, qui présente alors une famille avec deux frères atteints de paralysie spastique à début tardif. Cette description de la maladie sera ensuite complétée en 1898 par le docteur français Maurice Lorrain qui y consacra sa thèse, d'où l'appellation de **maladie de Strümpell-Lorrain** (Seeligmüller, 1876; Strümpell, 1880; Lorrain, 1898).

Les PSH englobent un groupe cliniquement et génétiquement hétérogène de maladies neurologiques caractérisées par une dégénérescence rétrograde, ou plus rarement un défaut de développement, des axones constituant les faisceaux moteurs cortico-spinaux (ou faisceaux pyramidaux) et des faisceaux sensitifs composant les colonnes postérieures. D'un point de vue clinique, ces affections sont à l'origine d'un syndrome pyramidal prédominant aux membres inférieurs et, principalement caractérisé par une spasticité, des réflexes ostéotendineux exagérés et une faiblesse musculaire pouvant conduire à une paralysie.

II.A Caractéristiques cliniques des PSH

II.A.1 Prévalence et variations géographiques

Les PSH sont des maladies génétiques rares dont la prévalence est estimée de 1 à 10/100000 individus. Cette prévalence varie en fonction des territoires géographiques allant de moins de 1/100000 au Japon à 9,6/100000 dans certaines régions d'Espagne (Tableau 1). Ces variations peuvent être attribuées à une hétérogénéité dans les critères de diagnostic et les méthodologies épidémiologiques utilisés au sein des différentes études (Ruano *et al.*, 2014), ou aux différents fonds génétiques de ces populations ainsi qu'à l'influence de facteurs environnementaux.

Pays	Référence	Population	Nb. de patients	Prévalence / 10 ⁵
Espagne	Polo et al., 1993	510000	49	9,6
	Brignolio et al., 1986	2327996	31	1,3
Italie	Filla et al., 1992	335211	9	2,7
	Leone et al., 1995	115270	5	4,3
Estonie	Braschinsky et al., 2009	1340000	59	4,4
Norvège	Erichsen et al., 2009	2633893	464	7,4
Portugal	Coutinho et al., 2013	10322000	418	4,1

TABLE 1 – **Prévalences observées en Europe selon plusieurs publications rapportées par Ruano *et al.*, 2014.** La prévalence en Europe varie de 1,3 à 9,6/100000. L'hétérogénéité de ces prévalences peut être due aux différences génétiques entre les populations mais également aux approches méthodologiques distinctes utilisées dans ces études.

II.A.2 Symptomatologie des PSH

Les symptômes associées à une atteinte des faisceaux cortico-spinaux sont généralement regroupés sous le terme **de syndrome pyramidal**, qui se manifeste principalement par une spasticité des membres, qui correspond à une raideur musculaire résultant d'une contraction anarchique et intempestive des muscles squelettiques, une hyperréflexie ostéotendineuse (réflexes exagérés), une anomalie du tonus musculaire (hypertonie) ainsi qu'à la présence du signe de Babinski, qui correspond à l'extension lente et majestueuse du gros orteil en réponse à une stimulation du bord externe de la voûte plantaire. Chez les patients atteints de PSH, ce syndrome spastique apparaît de façon bilatérale et progressive, et prédomine au niveau des membres inférieurs. Suivant son degré de sévérité, ce syndrome va conduire à des difficultés de la motricité volontaire pouvant aller jusqu'à la paralysie complètes des deux jambes (Polo *et al.*, 1993).

Cependant, bien qu'ils apparaissent plus tardivement au cours de la progression de la maladie et qu'ils soient observés à de plus faibles fréquences, d'autres symptômes sont également inclus dans le diagnostic des PSH. Parmi ceux-ci, on retrouve des anomalies sensorielles au niveau des extrémités distales des membres inférieurs, principalement une réduction du sens vibratoire, des troubles du sphincter urinaire (mictions impérieuses et difficultés à uriner), des « pieds creux » (Salinas *et al.*, 2008) ainsi que dans de rares cas, des troubles de l'érection et/ou une perturbation du sphincter anal (McDermott *et al.*, 2000).

II.B Une importante variabilité clinique

Bien que l'atteinte neurologique soit constante dans le cas des formes pures de PSH, l'expressivité clinique de ces affections est extrêmement hétérogène d'un individu à un autre, qu'il appartienne ou non à la même famille. Cette variabilité clinique inter- et intra-familiale qui caractérise les PSH concerne aussi bien l'âge d'apparition des symptômes que la progression, la sévérité et l'étendue de la maladie. De plus, la pénétrance, c'est-à-dire la fréquence à laquelle un individu porteur d'une mutation dans un gène de PSH présente le phénotype clinique associé, est incomplète et dépendante

de l'âge. En effet, on estime à 25%, la proportion de porteurs asymptomatiques (McDermott *et al.*, 2000). Cette variabilité phénotypique inter- et intra-familiale souligne l'importance de facteurs génétiques (gènes modificateurs) et épigénétiques dans l'expressivité du phénotype, et empêche une prédiction précise de l'évolution de la maladie chez les patients (Fink, 2013).

II.B.1 Classification clinique des PSH : formes pures et formes complexes

Face à la grande variabilité phénotypique observée chez les patients souffrant de PSH, Anita Harding proposa en 1983, une classification de ces affections en deux grandes catégories :

- les formes dites pures, qui se manifestent principalement par un syndrome pyramidal prédominant aux membres inférieurs associé ou non à des troubles sphinctériens et/ou à une perte de la sensibilité profonde au niveau des extrémités distales, et
- les formes complexes, dans lesquelles ce syndrome pyramidal est associé à un large registre d'autres signes cliniques d'ordre neurologique ou non, incluant une neuropathie périphérique, une ataxie cérébelleuse, une dysarthrie, un retard mental, une atrophie optique, un nystagmus, une rétinite pigmentaire, une surdité ou encore une atrophie du corps calleux (Klebe *et al.*, 2015).

Bien qu'en 1983, Harding présentait cette classification clinique des PSH comme provisoire, stipulant que les différents apports de la génétique et de la physiopathologie la modifieraient ("This classification is, of course, at best provisional", Harding, 1983), cette dernière reste communément utilisée lors du diagnostic clinique à ce jour.

II.B.2 Âge d'apparition et progressivité des symptômes

L'âge d'apparition des symptômes est extrêmement variable d'un patient à un autre, allant de la petite enfance (avant l'âge de 2 ans) à l'âge adulte (Fink, 2013) et varie parfois en fonction du gène à l'origine de ces affections. Si la grande majorité des patients, tout gène morbide confondu, ne développent pas de symptômes avant l'âge de 30 ans, les patients porteurs de mutations dans le gène *SPG3A* (SPG pour Spastic Paraplegia Gene ou Gène de Paraplégie Spastique) seront typiquement

LES PARAPLÉGIES SPASTIQUES HÉRÉDITAIRES (PSH)

diagnostiqués avant l'âge de 10 ans, tandis que 30% des patients de PSH liée au gène *SPG4* le seront avant l'âge de 20 ans (Salinas *et al.*, 2008). De plus, une étude récente menée sur une cohorte de 608 patients souffrant d'au moins huit formes génétiques différentes de PSH décrit la distribution de l'âge d'apparition des premiers symptômes comme bimodale, avec un premier pic avant 5 ans et un second vers 40 ans (Figure 2 ; Schüle *et al.*, 2016). Ainsi, bien que la littérature médicale soit dominée par l'étude de cas adultes de PSH, une part non négligeable de patients développe des symptômes durant l'enfance ou l'adolescence, ce qui suggère l'existence d'une composante développementale dans la pathogénèse des PSH (Tableau 2 ; de Bot *et al.*, 2010).

Gène associé	Tranche d'âge	Proportion des patients	Référence
<i>SPG3A</i>	< 10 ans	Typique	Abel <i>et al.</i> , 2004
<i>SPG4</i>	< 20 ans	30%	Fonknechten <i>et al.</i> , 2000
<i>SPG31</i>	< 20 ans	70%	Beetz <i>et al.</i> , 2008
<i>SPG6</i>	< 20 ans	Typique	Bien-Willner <i>et al.</i> , 2006
<i>SPG11</i>	< 20 ans	Typique	de Bot <i>et al.</i> , 2010

TABLE 2 – Littérature sur les cas de PSH avec un âge d'apparition précoce. De nombreux patients, présentant entre autres des formes pures de la maladie, ont été rapportés avant l'âge de 18 ans dans diverses publications. Dans certaines formes de la maladie, rares sont les patients diagnostiqués après 20 ans. D'après de Bot *et al.* 2010.

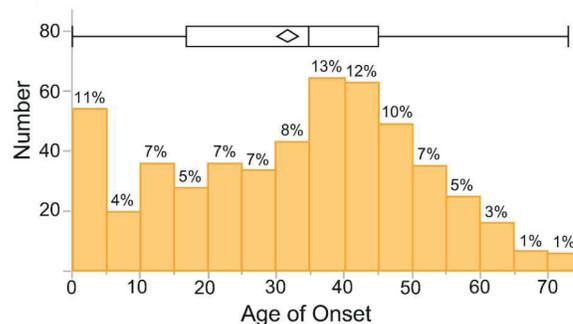


FIGURE 2 – Distribution de l'âge d'apparition des symptômes sur 608 patients atteints de PSH. La moyenne est de 30,8 ans (losange). Cette distribution est bimodale, avec un premier pic durant la petite enfance (avant 5 ans) et un second pic autour de 40 ans. Extrait de Schüle *et al.* 2016.

Bien que très variable en fonction des patients, l'évolution de la maladie et plus précisément du handicap moteur est en général très lente et se résume en trois étapes caractéristiques : (1) une phase de « latence », qui dure entre 5 et 10 ans après l'apparition des premiers symptômes et qui se caractérise par un état quasi stationnaire du handicap, suivie d'une (2) phase d'aggravation rapide et inexorable des symptômes qui atteindra finalement (dans un laps de temps variable) (3) un « plateau fonctionnel », phase au cours de laquelle la progression de la maladie stagne à nouveau. Cette étape finale de « plateau fonctionnel » est souvent associée à un ralentissement du processus dégénératif, couplé à une régénération axonale stimulée par les traitements symptomatiques et notamment l'exercice physique, et à une compensation fonctionnelle due à la plasticité neuronale (Fink, 2013). De plus, les formes les plus précoces de la maladie (débutant avant 35 ans) sont souvent celles qui présentent l'évolution la plus lente, avec des symptômes invariables sur plusieurs décennies et une faible proportion de patients ne pouvant plus marcher à des âges avancés (McDermott *et al.*, 2000).

II.B.3 La sévérité des symptômes

En règle générale, les PSH sont considérées comme des maladies « bénignes » puisqu'elles sont majoritairement responsables d'une invalidité modérée et qu'elles n'affectent en aucun cas l'espérance de vie des patients. Cependant, la sévérité des troubles locomoteurs qu'elles provoquent est particulièrement hétérogène d'un patient à un autre.

En 1990, Schady et Sheard classifièrent cette sévérité suivant une échelle à quatre degrés qui incluaient respectivement des patients : (1) avec peu ou pas de symptômes ; (2) présentant une démarche raide mais capables de se déplacer sans aide ; (3) incapables de se déplacer sans l'aide de béquilles ou d'un déambulateur et (4) en fauteuil roulant ou alités (Schady and Sheard, 1990). Cette échelle d'évaluation de la sévérité a récemment été revisitée et affinée afin de mieux préciser le statut clinique du patient (SPRS pour Spastic Paraplegia Rating Scale). Treize critères neurologiques tels

que la distance marchée, la capacité à franchir des escaliers, la spasticité des différents membres ou encore la douleur ou les dysfonctionnements de la vessie (Figure 3 ; Schüle *et al.*, 2016) sont désormais évalués au cours de l'examen clinique et notés selon un score de sévérité allant de 0 à 52, qui a été corrélé aux quatre degrés de sévérité de Schady and Sheard (1990 ; Figure 3).

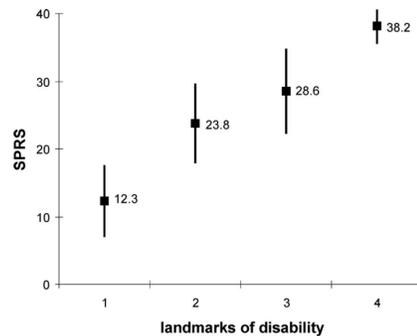


FIGURE 3 – **Corrélation entre le score SPRS (ordonnée) et la classification en 4 degrés du handicap (abscisse) basée sur 63 patients provenant de 50 familles.** Le score SPRS s'étend de 0 (pas de manifestation clinique) à un maximum de 52 points (symptômes les plus sévères). Le score peut être établi en 15 minutes et ne requiert aucun équipement particulier. De plus, il est corrélé aux 4 degrés de sévérité de la maladie décrits par Schady et Sheard (1990). Extrait de Schüle *et al.* 2016.

II.C Neuropathologie

II.C.1 Anatomopathologie des PSH

D'un point de vue neuropathologique, les PSH se caractérisent par la dégénérescence des faisceaux (1) moteurs descendants ou cortico-spinaux et (2) sensoriels ascendants constituant les colonnes dorsales (Fasciculus gracilis et cunéiforme) ainsi que dans 50% des cas (3) des faisceaux spino-cérébelleux. La dégénérescence des fibres s'observe en histologie par une pâleur anormale de ces faisceaux suite à une coloration de la gaine de myéline (Figure 4 ; Wharton *et al.*, 2003). Cette dégénérescence axonale est dite **rétrograde** et est considérée comme **dépendante de la longueur** puisqu'elle concerne plus spécifiquement les faisceaux les plus longs du système nerveux central et est prédominante au niveau de leurs extrémités distales. En effet, une étude anatomopathologique réalisée sur 6 cas post-mortem

de PSH et 30 individus contrôles, révèle une diminution significative de l'aire et de la densité axonale des faisceaux cortico-spinaux chez des individus atteints de PSH, qui apparaît plus importante dans la région lombaire de la moelle épinière, ainsi qu'une dégénérescence axonale accrue dans la partie cervicale du cordon postérieur (DeLuca *et al.*, 2004).

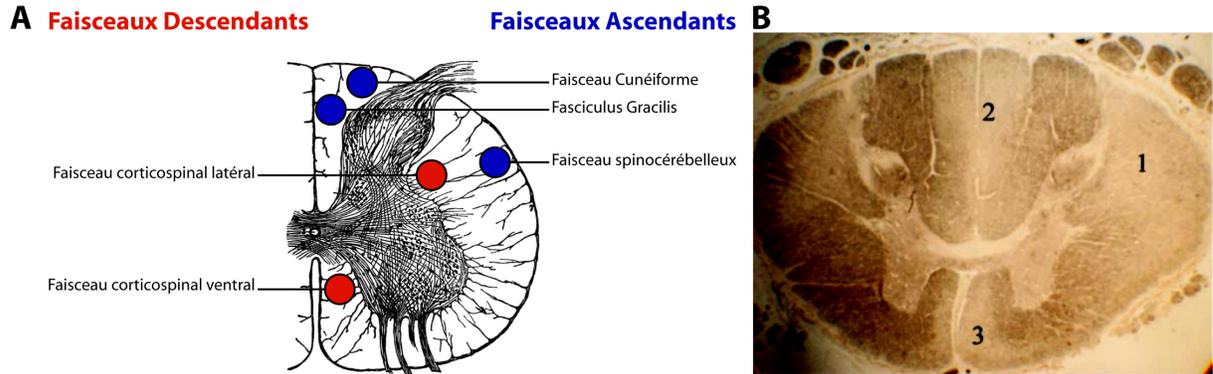


FIGURE 4 – **Atteinte des faisceaux moteurs et sensoriels dans les PSH.** **A.** Schéma d'une coupe transversale de la moelle épinière au niveau lombaire. Sont notés par des points, les zones de la matière blanche où cheminent les axones des différents faisceaux descendants (points rouges) et ascendants (points bleus). Les PSH sont caractérisées par une atteinte de ces différents faisceaux moteurs ou sensoriels. Adapté de Martin and Fitz 1898. **B.** Lésions de la moelle épinière chez un patient atteint de PSH. Marquage de la myéline sur une coupe transversale au niveau thoracique. On y note une pâleur des faisceaux spinocérébelleux et cortico-spinal latéral (1), du fasciculus gracilis (2) ainsi que du faisceau cortico-spinal ventral (3), attestant de la dégénérescence de ces faisceaux d'axones. Extrait de Wharton *et al.* 2003.

Plus récemment, la présence d'axones dilatés gorgés de neurofilaments et de mitochondries au niveau des faisceaux cortico-spinaux et des colonnes dorsales chez deux patients atteints de PSH liées au gène *SPG4* fut décrite par Kasher *et al.* (2009). De façon notable, ces anomalies caractéristiques d'un défaut de transport axonal, avaient préalablement été observées chez différents modèles murins de PSH, suggérant une conservation des mécanismes pathogéniques entre la souris et l'homme (Kasher *et al.*, 2009).

En outre, l'Imagerie à Résonance Magnétique (IRM) révèle une atrophie médullaire modérée chez les patients atteints de formes pures de PSH, qui s'accompagne parfois d'une légère atrophie cérébrale ou cérébelleuse (McDermott *et al.*, 2000; Hedera *et al.*, 2005; Fink, 2006; Kassubek *et al.*, 2006). Cependant, dans certaines formes complexes de PSH, cette atrophie cérébrale, qui apparaît plus

fréquente et plus marquée, affecte les substances blanche et grise. D'autres anomalies révélées par IRM comme un amincissement ou une agénésie du corps calleux sont plus spécifiquement observées dans les formes complexes de PSH liées aux gènes *SPG11* et *SPG15* (Casali *et al.*, 2004; Stevanin *et al.*, 2007; Pensato *et al.*, 2014).

Une hypoplasie du tractus cortico-spinal, plus prononcée au niveau du bulbe rachidien, a également été observée dans des formes infantiles de PSH liées au gène *SPG1*, indiquant qu'un défaut de développement de ces faisceaux pourrait également contribuer à la pathogénèse de ces affections (Yamasaki *et al.*, 1995; Casari and Rugarli, 2001).

De façon générale, les corps cellulaires des neurones pyramidaux demeurent intacts (Casari and Rugarli, 2001), bien qu'une légère diminution du nombre de cellules de Betz (cellules pyramidales de la couche V du cortex) ait été observée chez certains patients (Bruyn, 1992). Les motoneurones inférieurs, innervés par les faisceaux cortico-spinaux sont également préservés dans la grande majorité des cas. Cependant, dans de rares cas de PSH, la perte d'une partie de ces cellules (Behan and Maia, 1974; McDermott *et al.*, 2000) ou des anomalies cytologiques au niveau de leur soma comme des dépôts hyalins ou des accumulations anormales de mitochondries et de peroxysomes ont été rapportées (McDermott *et al.*, 2000).

De plus, il est important de préciser qu'il n'y a aucune évidence de démyélinisation primaire dans ces affections. En effet, la destruction de la gaine de myéline observée au niveau des faisceaux cortico-spinaux et des colonnes postérieures chez certains patients atteints de forme pure de PSH est la conséquence de la dégénérescence axonale primaire de ces faisceaux (Casari and Rugarli, 2001).

Certaines études anatomopathologiques décrivent également une faible prolifération gliale au niveau de la moelle épinière de certains cas de PSH (Wharton *et al.*, 2003). Cependant, cette dernière est proportionnelle à l'étendue de la dégénérescence axonale et semble vraisemblablement secondaire à la dégénérescence axonale, au même titre que la démyélinisation. Des agrégats pathologiques de la

protéine Tau ont également été observés au niveau de l'hippocampe, du néocortex et du système limbique d'un patient atteint de PSH liée au gène *SPG4* (White *et al.*, 2000). Cependant, dans ce cas, aucune donnée ne permet de préciser si cette tauopathie a un lien avec la mutation de ce gène ou si elle est apparue de façon fortuite chez ce patient.

La mesure électrophysiologique des potentiels évoqués corticaux montre que la vitesse de conduction nerveuse est souvent diminuée au niveau du tractus cortico-spinal des patients (Pelosi *et al.*, 1991). De même, les potentiels somatosensoriels évoqués, enregistrés au niveau des extrémités distales des membres inférieurs, révèlent une vitesse de conduction ralentie chez certains patients. Les électromyogrammes sont, quant à eux, normaux dans la majorité des formes pures. Toutefois, bien que la distribution de la dégénérescence axonale suggère une atteinte très spécifique des axones les plus longs du système nerveux central, plusieurs études suggèrent qu'un nombre non négligeable de formes génétiques de PSH pourraient être associées à un dysfonctionnement d'autres populations neuronales et tout particulièrement des nerfs périphériques sensoriels et moteurs, s'étendant également sur de très longues distances. En effet, bien qu'aucune atteinte des neurones périphériques n'ait été signalée lors des premières études neuropathologiques (Reid, 1999), 17% des patients atteints de PSH liée au gène *SPG3A* présentent une neuropathie périphérique sensori-motrice avec une diminution significative des vitesses de conduction nerveuse au niveau des neurones fibulaires, tibiaux et suraux (Ivanova *et al.*, 2007). A ce jour, plus de 10 formes génétiques de PSH présentent ce type d'atteinte périphérique (Fink, 2013). Par ailleurs, une étude récente menée sur 128 patients issus de 109 familles allemandes présentant des formes pures et complexes de PSH révèle une altération de la conduction nerveuse au niveau des nerfs périphériques chez 44% des cas observés, qui ne montraient au préalable aucun signe de neuropathie périphérique (Karle *et al.*, 2013).

Enfin, les biopsies musculaires de certains patients atteints de PSH liées à des mutations dans des gènes clés de l'homéostasie mitochondriale, comme *SPG7*, révèlent des anomalies cytologiques des cellules musculaires, communément associées à des dysfonctionnements de la phosphorylation oxydative (Casari and Rugarli, 2001).

II.C.2 Une expressivité clinique surprenante

Si l'atteinte des faisceaux cortico-spinaux trouve son expressivité dans le syndrome pyramidal (spasticité et hyperréflexie) des membres inférieurs, la dégénérescence des cordons postérieurs, pour ainsi dire muette d'un point de vue clinique, n'engendre qu'une perte modérée de la sensibilité profonde chez certains patients, et ce, en dépit d'une atteinte similaire des faisceaux sensoriels et moteurs sur le plan neuropathologique. De même, bien que les faisceaux spino-cérébelleux soient affectés chez plus de 50% des patients, les manifestations cliniques associées à cette dégénérescence sont très rares. Seule une légère ataxie observée chez certains cas atteints de formes pures de PSH pourrait être liée à l'atteinte de ces axones (Reid, 1999; McDermott *et al.*, 2000).

II.D Diagnostic clinique

Le diagnostic des PSH consiste en un examen clinique et neurologique approfondi et s'appuie sur l'étude des antécédents familiaux et personnels du patient. En effet, la présence d'un historique familial d'une affection similaire compatible avec un mode de transmission autosomique dominant, récessif ou lié au chromosome X est un critère obligatoire du diagnostic de PSH, bien que l'absence de donnée familiale et l'existence de cas asymptomatiques en compliquent parfois la confirmation. Parmi les critères cliniques de diagnostic, on retrouve une détérioration progressive de la démarche, la présence de signes neurologiques caractéristiques d'un syndrome pyramidal comme la spasticité musculaire, l'hyperréflexie ostéotendineuse et un signe de Babinski uni- ou bilatéral (McDermott *et al.*, 2000). Il est important de préciser que la spasticité doit apparaître de façon bilatérale et progressive et se restreindre aux membres inférieurs. De plus, d'autres examens complémentaires comme l'IRM, le dosage des acides gras à longue chaîne, ainsi qu'une analyse du liquide céphalo-rachidien et des potentiels évoqués moteurs sont nécessaires pour affiner le diagnostic et permettre d'exclure (par diagnostic dit différentiel) la présence d'autres affections neurologiques tels que des anomalies struc-

turales et vasculaires (tumeur spinale), des signes inflammatoires (sclérose en plaque, sarcoïdose), des défauts métaboliques (carences en vitamines, leucodystrophies) ou encore des signes infectieux (paraplégies spastiques tropicales, syphilis) caractéristiques d'autres maladies neurologiques pouvant également affecter les faisceaux cortico-spinaux (Hensiek *et al.*, 2015).

L'IRM du cerveau pratiqué lors du diagnostic servait jusqu'ici principalement à exclure d'autres maladies neurologiques. Cependant, une nouvelle technique d'imagerie avancée, l'IRM de diffusion (ou DTI pour Imagerie du Tenseur de Diffusion), s'est révélée fructueuse pour détecter des anomalies structurales de la matière blanche, ce qui permet de caractériser de façon précoce le patron de la lésion et de mesurer sa progression en vue d'identifier des « biomarqueurs » la caractérisant (Duning *et al.*, 2010).

II.E Approche thérapeutique

Il n'existe à ce jour aucun traitement permettant de retarder, prévenir voire bloquer la dégénérescence axonale à l'origine des PSH. Les seuls traitements disponibles sont purement symptomatiques et visent à réduire la spasticité par le biais de médication et de rééducation fonctionnelle. Parmi les traitements symptomatiques de la spasticité on retrouve : la prise d'anti-spastiques et de myorelaxants tels que le Dantrolène et le Tizanidine, des injections intramusculaires de Botox (toxine Botulique) visant à réduire les contractions intempestives des muscles squelettiques et leur fatigabilité en empêchant la propagation de l'influx nerveux, ou encore la pose d'une pompe intrathécale délivrant le myorelaxant Baclofène, un agoniste des récepteurs aux GABA-B, principal neurotransmetteur inhibiteur du système nerveux central (Hill and Bowery, 1981). Son action vise à empêcher l'excitation prolongée des neurones et ainsi à diminuer l'hypertonie et l'hyperréflexie (Rode *et al.*, 2003). Le Baclofène est le premier médicament anti-spastique à avoir été commercialisé. Il reste aujourd'hui le plus utilisé pour réduire la spasticité des membres inférieurs et améliorer la marche chez certains patients (Klebe *et al.*, 2005; Hecht *et al.*, 2008; Margetis *et al.*, 2014).

En outre, l'Oxybutynine est un médicament qui est, lui, très fréquemment prescrit pour réduire les problèmes d'incontinence urinaire (Tableau 3; Fink, 2013).

LES PARAPLÉGIES SPASTIQUES HÉRÉDITAIRES (PSH)

Enfin, d'un point de vue général, la kinésithérapie et l'exercice physique sont hautement recommandés afin d'améliorer les mouvements et la force musculaire au niveau des extrémités distales ainsi que les conditions cardio-vasculaires. Une stimulation du nerf fibulaire et la pose d'orthèses au niveau des chevilles permettent également de réduire la marche sur la pointe des pieds très caractéristique des PSH et liée à l'hypertonie des muscles extenseurs (Fink, 2013).

Molécule	Mécanisme d'action	Effet
Baclofène	Agoniste des récepteurs GABA-B	Diminution de l'hypertonie et de l'hyperreflexie
Benzodiazépines	Agoniste des récepteurs GABA-A (ouverture du canal chlore)	Myorelaxant, anticonvulsif
Tizanidine	Dérivé de l'imidazole, agoniste des récepteurs adrénergiques	Diminution du tonus musculaire
Dantrolène	Inhibiteur de la libération intracellulaire de calcium	Réduction de l'hyperreflexie, facilitation de la mobilité passive
Oxybutynine	Inhibiteur des effets de l'acétylcholine	Diminution de l'amplitude et de la fréquence des contractions et de la pression vésicale
Botox	Bloque la libération d'acétylcholine	Diminution localisée de l'activité musculaire

TABLE 3 – **Mécanismes d'action des différentes molécules utilisées en traitement symptomatique.** Elles peuvent être classées en quatre groupes : les GABAergiques (jaune), les adrénergiques (rouge), les antispastiques périphériques (vert) et les inhibiteurs cholinergiques (bleu). Informations tirées du Vidal (www.vidal.fr).

III Un nombre grandissant de formes génétiques pour toujours plus de complexité

III.A Formes Sporadiques et Familiales

Les PSH sont des maladies monogéniques qui se caractérisent par une extrême hétérogénéité génétique avec à ce jour pas moins de 67 gènes identifiés dont plus de 25 en l'espace de deux ans grâce aux nouvelles approches génétiques comme le séquençage d'exomes, une technique particulièrement puissante pour l'identification de variants génétiques rares (Novarino *et al.*, 2014; Tesson *et al.*, 2015).

Il existe des formes familiales et des formes sporadiques de PSH, toutes aussi hétérogènes sur le plan génétique (Figure 5). A l'origine des formes sporadiques, on retrouve souvent des mutations *de novo*, une pénétrance incomplète du phénotype dans la famille nucléaire, ou encore une absence d'historique familial de la maladie. Elles représentent en moyenne 33% des cas de PSH contre 66% de cas familiaux (Figure 5 ; Lo Giudice *et al.*, 2014). Cependant leur fréquence varie en fonction des pays. Par exemple, une étude menée sur 194 sujets provenant de 65 familles Norvégienne (Erichsen *et al.*, 2009) a permis d'estimer à 19% la proportion de cas sporadiques de PSH dans cet échantillon.

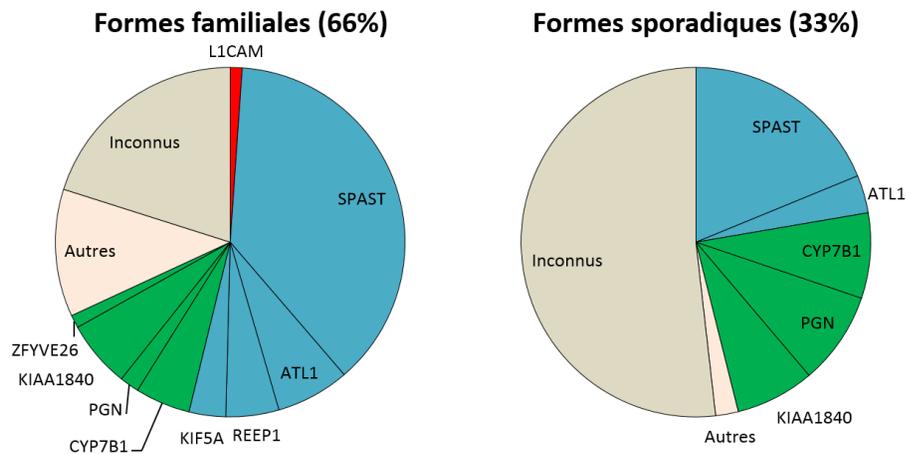


FIGURE 5 – **Données épidémiologiques provenant du réseau italien de PSH (1707 sujets).** Représentation de la distribution des patients porteurs d'une mutation sur un gène à transmission autosomique dominante (bleu), autosomique récessive (vert) ou liée au chromosome X (rouge) pour les cas familiaux ou sporadiques. Extrait de Lo Giudice *et al.* 2014.

III.B La génétique des formes familiales

Les formes familiales de PSH sont transmises selon tous les modes connus de ségrégation : autosomique dominant (PSH-AD), autosomique récessif (PSH-AR) et lié au chromosome X (PSH-X). Les formes autosomiques dominantes sont les plus fréquentes puisqu'elles concernent 70 à 80 % des cas de PSH (Depienne *et al.*, 2007a).

LES PARAPLÉGIES SPASTIQUES HÉRÉDITAIRES (PSH)

Les PSH-AD correspondent dans leur grande majorité à des formes pures de PSH. Parmi la dizaine de gènes responsables de PSH-AD identifiés à ce jour, trois gènes sont à l'origine de plus de la moitié des cas : *SPG4* (40%), *SPG3A* (10%) et *SPG31* (5%), codant respectivement la spastin, atlastin-1 et REEP1. Les autres gènes incriminés dans les PSH-AD ne représentent qu'1% des cas, et certains n'ont été identifiés comme responsable de la maladie que dans une unique famille.

Les formes autosomiques récessives sont moins fréquentes puisqu'elles ne concernent qu'environ 10 à 20% des patients. Contrairement aux PSH-AD, les PSH-AR sont dans leur grande majorité des formes complexes de PSH et leur hétérogénéité génétique est particulièrement prononcée. En effet, plus de 40 formes génétiques distinctes de PSH-AR, dont 15 découvertes récemment (Novarino *et al.*, 2014), ont été décrites à ce jour. Les gènes *SPG11* codant la spatacin (KIA1840) et *SPG15* codant la spastizin (ZFYVE26) sont les gènes les plus fréquemment incriminés dans ces formes récessives et les phénotypes associés à leurs mutations sont très similaires (i.e., agénésie du corps calleux, anomalies de la substance blanche et neuropathie axonale ; Pensato *et al.*, 2014). Les gènes *SPG5* et *SPG7* codant CYP7B1 et la paraplegin sont également plus fréquemment mutés dans les PSH-AR.

Les formes liées au chromosome X sont beaucoup plus rares. Cinq locus de PSH-X ont été cartographiés à ce jour et 3 gènes identifiés : le gène *SPG1* codant L1-CAM, *SPG2* codant PLP et *SPG22* codant MCT8.

Une forme maternelle (liée à l'ADN mitochondrial) et affectant le gène *ATP6* a été décrite dans une famille de PSH. La mutation de ce gène précédemment associé à d'autres syndromes, engendre l'altération de l'activité ATP synthase (Verny *et al.*, 2011).

III.C Un déséquilibre du sex-ratio assez général

En 1977, Holmes et Shaywitz décrivent un déséquilibre du sex-ratio en faveur des hommes, dans les PSH-AD (57%) comme dans les PSH-AR (61%) d'après le regroupement de 536 cas provenant de 104 familles différentes (Holmes and Shaywitz, 1977). Depuis, une méta-analyse incluant uniquement des patients liés au gène *SPG4* (gène majoritaire de PSH-AD) a confirmé cette tendance avec 56,4% de

cas masculins (Proukakis *et al.*, 2011). Ce déséquilibre du sex-ratio pourrait être lié à une pénétrance réduite ou à une apparition plus tardive des symptômes dans la population féminine souffrant de PSH. Face à une telle constatation, un effet protecteur des œstrogènes a été évoqué. Il est à noter qu'un tel déséquilibre a également été observé dans la Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA), une autre maladie neurodégénérative affectant entre autres les faisceaux cortico-spinaux, et que cette différence s'amointrit passé l'âge de la ménopause (Manjaly *et al.*, 2010).

III.D Un manque de corrélation Génotype/Phénotype

De façon étonnante, très peu de corrélations génotype/phénotype émanent de cette extrême variabilité clinique et génétique qui caractérise les PSH. En effet, l'importante variabilité clinique inter- et intra-familiale fait obstacle à la prédiction précise du phénotype d'un patient porteur d'une mutation donnée (Fink, 2013). Cependant, des spécificités propres à certaines formes génétiques sont décrites et permettent d'affiner ou d'orienter le diagnostic génétique.

En effet, une agénésie du corps calleux accompagnée de retards mentaux sont deux signes caractéristiques des PSH liées aux gènes *SPG11* et *SPG15*. En revanche, la présence d'une atrophie musculaire couplée à la PSH est plus fréquemment observée chez des patients présentant une mutation des gènes *SPG10*, *SPG17* ou *SPG20* (Neuhäuser *et al.*, 1976; Auer-Grumbach *et al.*, 2005). De plus, une apparition précoce des symptômes, pendant la petite enfance, orientera plutôt le diagnostic génétique vers le gène *SPG3A*. Enfin, la majorité des formes pures à transmission autosomique dominante, seront en priorité testées pour les gènes *SPG4* et *SPG3A* (Figure 6 ; Depienne *et al.*, 2007a).

LES PARAPLÉGIES SPASTIQUES HÉRÉDITAIRES (PSH)

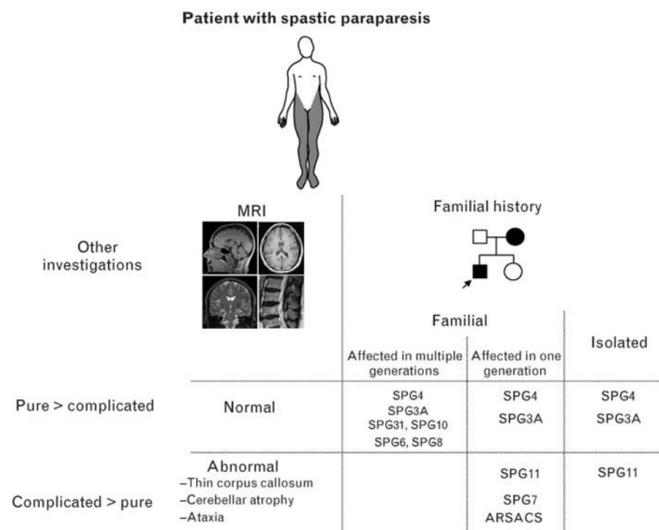


FIGURE 6 – **Diagnostic clinique et génétique des formes de PSH.** Si la forme de PSH est dite pure (notamment, si aucune anomalie n'est détectée à l'IRM) les gènes *SPG4* et *SPG3A* seront systématiquement testés au vu de l'incidence élevée des mutations dans ces gènes. Si le diagnostic décèle une forme complexe, le gène *SPG11* sera testé en priorité en cas d'agénésie du corps calleux tandis que les gènes *SPG7* et *SACS* seront analysés en cas d'ataxie ou d'atrophie cérébelleuse associée. Extrait de Depienne *et al.* 2007a.

Récemment, une étude visant à clarifier les phénotypes des formes génétiques les plus fréquentes de PSH à partir de 519 familles révèle la présence d'une ataxie chez 50% des cas de PSH liées à une mutation du gène *SPG5*, une dysarthrie chez 25% des patients porteurs de mutations dans le gène *SPG7* ainsi que des défauts cognitifs et des signes extrapyramidaux dans les cas de PSH liées au gène *SPG11* (Figure 7; Schüle *et al.*, 2016).

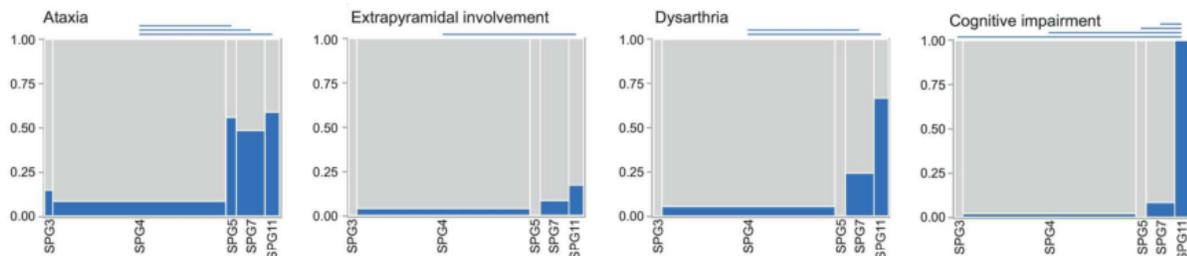


FIGURE 7 – **Spécificité de certains phénotypes parmi les formes les plus fréquentes de PSH.** L'ataxie est plus souvent retrouvée associée à la PSH chez les patients porteurs de mutations dans *SPG5*, *SPG7* ou *SPG11* alors que des signes extrapyramidaux, la dysarthrie ou encore un déficit cognitif apparaissent plus fréquemment et sélectivement chez les patients atteints de formes de PSH liées à *SPG11*. Adapté de Schüle *et al.* 2016.

Les avancées spectaculaires réalisées ces dernières années dans le diagnostic génétique des PSH ont permis de révéler d'importants chevauchements génétiques entre certains sous-types de PSH et d'autres maladies neurologiques ou neurodégénératives comme certaines formes d'ataxie ou de SLA (Figure 8 ; Orlichio *et al.*, 2010; Klebe *et al.*, 2015), étendant encore le spectre des phénotypes associés aux mutations de certains gènes de PSH comme *SPG3A* ou *SPG4*.

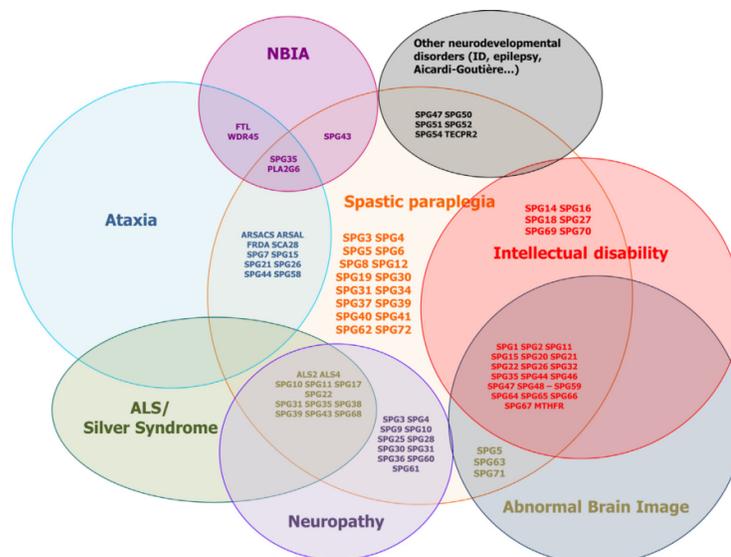


FIGURE 8 – **Appréciation globale du chevauchement génétique et clinique entre les PSH et d'autres maladies neurodégénératives.** Les avancées récentes dans le diagnostic génétique ont permis de mettre en évidence de multiples chevauchements cliniques et/ou génétiques entre les PSH et d'autres maladies neurologiques comme les ataxies héréditaires, la sclérose latérale amyotrophique (ou ALS), la sclérose latérale primitive (ou PLS), la maladie de Charcot-Marie-Tooth (ou CMT) ou encore la neurodégénérescence avec surcharge cérébrale en fer (NBIA). En outre, l'utilisation de nouvelles techniques de séquençage dans la pratique clinique a révélé un continuum entre les PSH et d'autres maladies neurodégénératives. Extrait de Klebe *et al.*, 2015.

IV Diversité des mécanismes pathogéniques

Elucider la fonction des protéines codées par ces nombreux gènes de PSH et disséquer les voies de signalisation dans lesquelles elles s'intègrent par le biais de modèles animaux et cellulaires constituent des étapes clés et incontournables à la compréhension des mécanismes pathogéniques à l'origine des PSH. Cependant, avant même de connaître la fonction de ces gènes, la grande taille des faisceaux

cortico-spinaux laissait présager que le dysfonctionnement des mécanismes cellulaires (transport axonal, trafic membranaire) assurant la communication entre le soma et la région distale de l'axone, situés parfois à près d'un mètre de distance, pourrait avoir des conséquences délétères dans l'homéostasie de ces faisceaux (Klebe *et al.*, 2015). Les données fonctionnelles accumulées ces dix dernières années sur un grand nombre de gènes de PSH ont permis d'étayer cette hypothèse et ont révélé une diversité des mécanismes pathogéniques moins étendue que celle attendue, au vu de l'hétérogénéité structurelle et fonctionnelle des 15 premiers gènes de PSH identifiés. En effet, la grande majorité des protéines de PSH semble aujourd'hui intervenir dans un nombre de processus cellulaires restreints (parfois même au sein des mêmes complexes macromoléculaires) qui au fur et à mesure des années apparaissent **interconnectés et/ou interdépendants** comme le trafic endo-lysosomal, la morphogénèse du réticulum endoplasmique et des gouttelettes lipidiques, le transport axonal, le fonctionnement mitochondrial, etc. (Figure 9 ; Klebe *et al.*, 2015) suggérant une origine commune à la vaste majorité des formes génétiques de PSH : **un défaut de remodelage et du trafic membranaires** (Lo Giudice *et al.*, 2014).

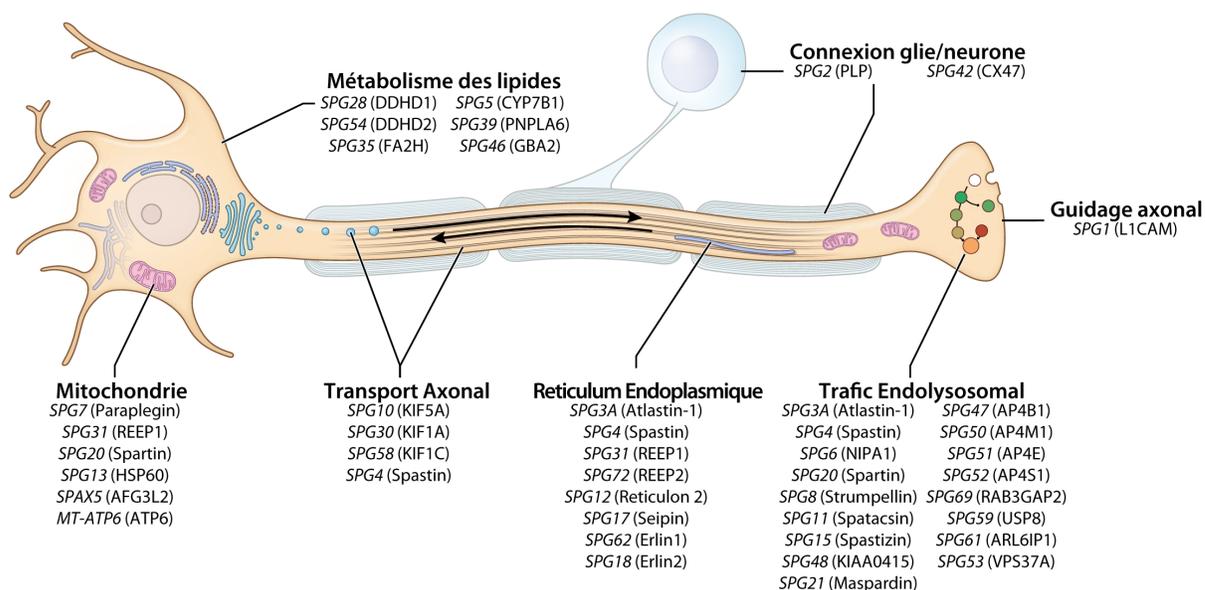


FIGURE 9 – **Vue d'ensemble des différents mécanismes pathogéniques à l'origine des PSH.** A ce jour, les nombreux gènes mutés dans les différentes formes de PSH codent des protéines impliquées dans peu de mécanismes cellulaires. Une altération des fonctions cellulaires essentielles à la survie et à l'homéostasie du neurone, telles le transport axonal, le trafic endo-lysosomal, la morphogénèse du réticulum endoplasmique, la synthèse et le stockage des lipides, le métabolisme de la mitochondrie conduit à la neurodégénérescence des faisceaux cortico-spinaux. En effet, ces perturbations entraînent des défauts de développement et de maintenance de ces très longs axones du système nerveux central. Modifié depuis Blackstone, 2012.

IV.A Processus cellulaires défectueux

IV.A.1 Altération du trafic endo-lysosomal

L'altération du trafic endo-lysosomal s'impose à ce jour comme le mécanisme pathogénique le plus fréquemment incriminé dans les PSH. En effet, parmi les 67 gènes de PSH déjà identifiés, 18 SPGs, incluant les gènes majeurs de PSH-AD et -AR (*SPG3A*, *SPG4*, *SPG15*, *SPG11* ; Tableau 4 ; Figure 10) codent des protéines ayant un rôle putatif ou avéré dans le trafic endo-lysosomal. Ce processus de trafic cellulaire, qui régule la concentration et la signalisation de nombreux récepteurs présents à la membrane plasmique, est déterminant pour l'interprétation des signaux extracellulaires par le neurone embryonnaire ou adulte. En effet, l'endocytose et le trafic vésiculaire en résultant contrôlent

LES PARAPLÉGIES SPASTIQUES HÉRÉDITAIRES (PSH)

à la fois (i) l'internalisation de ces récepteurs membranaires, (ii) leur recyclage au niveau de la membrane plasmique par des endosomes dits de recyclage, issus de la fission des tubules d'endosomes précoces, (iii) le regroupement et l'activation de leurs effecteurs dans des endosomes dits de signalisation ou encore (iv) leur dégradation, en les acheminant vers les endosomes tardifs puis les lysosomes (Figure 10 ; Katzmann *et al.*, 2002).

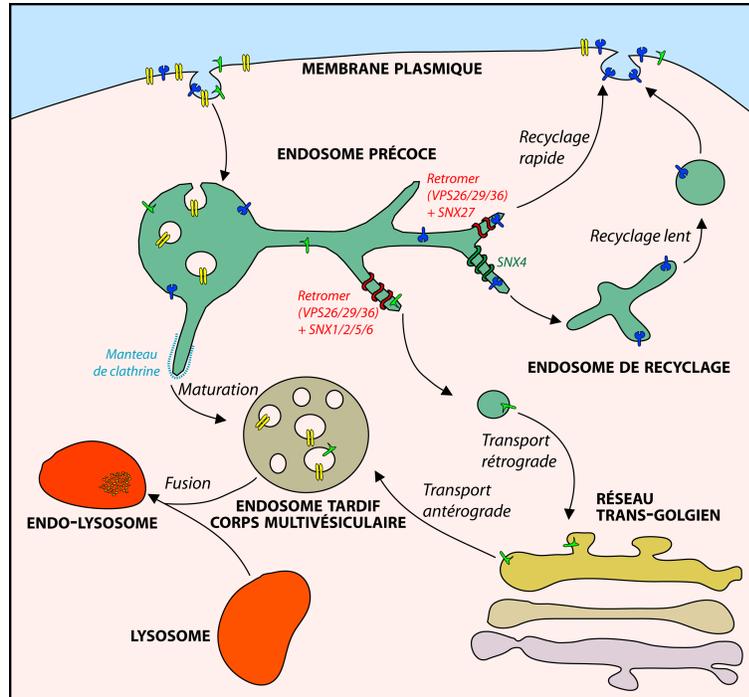


FIGURE 10 – Représentation schématique du trafic endo-lysosomal. L'endocytose est un processus essentiel à la régulation de la concentration et de la signalisation de nombreux récepteurs présents à la membrane plasmique. Après l'internalisation de ces récepteurs membranaires par endocytose, ceux-ci peuvent emprunter trois voies, qui consistent à : (1) être recyclés au niveau de la membrane plasmique, directement ou via des endosomes de recyclage, à la manière des récepteurs à la transferrin (récepteurs bleus) ; (2) être acheminés par transport rétrograde vers le réseau trans-Golgien comme c'est le cas pour les récepteurs au Mannose-6-phosphate (récepteurs verts) ; ou (3) être dégradés, via les endosomes tardifs qui après maturation fusionnent avec les lysosomes, à la manière des récepteurs de voies de signalisation comme celle des Bone Morphogenetic Proteins (récepteurs jaunes). L'équilibre entre la dégradation protéique et le recyclage des récepteurs à la membrane est crucial pour l'homéostasie cellulaire, car une distribution anormale d'un type de ces récepteurs pourrait entraîner une altération de la transduction du signal. D'après Gallon and Cullen 2015.

De plus, le trafic endosomal est également essentiel au maintien de l'identité et de la fonctionnalité des différents compartiments cellulaires impliqués. En effet, des perturbations de sortie de la voie d'endocytose, comme par exemple le mauvais acheminement des enzymes de dégradation dans le lysosome, vont affecter l'identité et la fonction de ce compartiment cellulaire et avoir des conséquences dramatiques sur l'homéostasie cellulaire. Résumées dans le Tableau 4, les protéines de PSH agissant dans le trafic endosomal sont des composants ou des régulateurs clés de complexes macromoléculaires essentiels à l'homéostasie du transport endo-lysosomal et intervenant à différentes étapes de ce processus. Par exemple, la spastin (*SPG4*) et la strumpellin (*SPG8*), altérées dans deux formes de PSH-AD, ont été récemment impliquées dans la fission des tubules endosomaux de recyclage (Allison *et al.*, 2013; Derivery *et al.*, 2009; Freeman *et al.*, 2013). En effet, la perte de fonction de ces deux protéines dans des cellules non-neuronales ou neuronales conduit à une tubulation anormale des endosomes, associée à des défauts de sortie de la voie d'endocytose des récepteurs à la transferrin dans le cas de la spastin (Allison *et al.*, 2013) ou des récepteurs au LDL (Low Density Lipoprotein) dans le cas de la strumpellin (Derivery *et al.*, 2009; Bartuzi *et al.*, 2016). De façon intéressante, ces deux protéines régulent la fission des tubules endosomaux via des mécanismes moléculaires différents. L'extension et la fission des tubules endosomaux dépend de l'action combinée du complexe macromoléculaire WASH (Wiskott-Aldrich Syndrome Protein and SCAR Homologue), qui régit la mise en place locale (i) d'un réseau d'actine branché exerçant une force de poussée sur la membrane du tubule, (ii) du moteur moléculaire dynein qui génère une force de traction s'opposant à la force de poussée de l'actine lors de son déplacement le long des rails de microtubules, et (iii) d'un anneau contractile de dynamin permettant la scission des membranes (Figure 11).

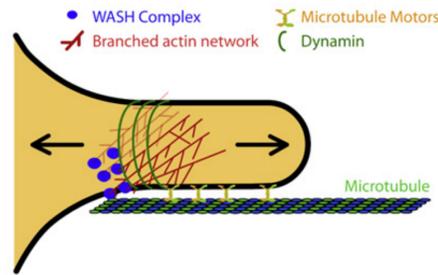


FIGURE 11 – **Mécanisme de fission des endosomes.** Schéma représentant les différentes forces exerçant une tension sur la membrane des tubules endosomaux nécessaires à leur fission. La flèche de gauche illustre la force de poussée exercée par le réseau d'actine branché généré par le complexe WASH alors que la flèche de droite indique la force de traction exercée par la dynein se déplaçant sur les microtubules. L'action concertée de ces deux forces opposées et de l'anneau contractile de dynamin se formant sur le tubule va permettre la scission de la membrane. Extrait de Derivery *et al.*, 2009.

En collaboration avec le groupe d'Evan Reid, notre équipe a montré que l'activité de cassure des microtubules exercée par la spastin est essentielle à la fission des tubules endosomaux et qu'un traitement au nocodazole, une drogue dépolymérisant les microtubules permet de sauver le phénotype de tubulation endosomale des cellules HeLa dépourvues de spastin (Allison *et al.*, 2013). En revanche, la strumpellin est un composant clé du complexe WASH nécessaire à la mise place du réseau d'actine branché indispensable à la fission des tubules endosomaux (Derivery *et al.*, 2009). Alternativement, la spartin (*SPG20* responsable d'une PSH-AR) et NIPA1 (*SPG6* impliqué dans une PSH-AD) régulent l'internalisation et la dégradation endocytiques des récepteurs aux Bone Morphogenetic Proteins (BMP), des morphogènes essentiels à la croissance des neurones moteurs (Wang *et al.*, 2007; Tsang *et al.*, 2009; Nahm *et al.*, 2013). De façon étonnante, sept gènes responsables de PSH-AR codent des sous-unités des manteaux moléculaires AP-4 (*SPG47*, *SPG50-52*; Abou Jamra *et al.*, 2011) et AP-5 (*SPG48*, *SPG11*, *SPG15*) présents à la surface de certains compartiments de la voie d'endocytose ou encore des protéines interagissant avec le manteau AP-5 (*SPG11* et *SPG15*). Les complexes AP-4 et AP-5 semblent respectivement impliqués dans le transport antérograde de cargos depuis le trans-Golgi vers les endosomes et le trafic de cargos vers les lysosomes (Hirst *et al.*, 2013a). De plus, AP-4 semble jouer un rôle essentiel dans le trafic polarisé. En effet, dans les neurones des souris *knockout* pour la sous-unité AP-4 β , certaines protéines spécifiques du compartiment

somatodendritique, comme les récepteurs aux LDL, AMPA ou encore $\delta 2$ au glutamate sont anormalement transportés dans l'axone (Matsuda *et al.*, 2008). En outre, la perte de fonction de la sous-unité ζ du manteau AP-5 codée par le gène *SPG48* conduit à une accumulation anormale de structures multilamellaires présentant la morphologie d'organites hybrides résultant de la fusion d'endosomes et de lysosomes. De façon notable, ces structures anormales, positives pour le marqueur lysosomal lamp-1, renferment du « matériel » cytoplasmique caractéristique des vésicules d'autophagie, et sont observées dans les fibroblastes de patients *SPG48* (Hirst *et al.*, 2015) et *SPG15* (Vantaggiato *et al.*, 2013; Renvoisé *et al.*, 2014), mais également dans le système nerveux des souris mutantes *SPG15* et *SPG11* (Khundadze *et al.*, 2013), ainsi que dans des cellules HeLa déplétées en spastizin (*SPG15*) ou spatacin (*SPG11*) (Chang *et al.*, 2014). De plus, la spatacin et la spastizin ont été impliquées dans le phénomène de renouvellement des lysosomes par l'autophagie. En effet, leur perte de fonction conduit à une réduction dramatique du nombre de lysosomes circulants, ce qui s'avère délétère pour le « grand nettoyage » des cellules par l'autophagie (Chang *et al.*, 2014; Varga *et al.*, 2015).

Pour conclure, en perturbant l'homéostasie du trafic endo-lysosomal, les mutations de ces différents gènes de PSH vont altérer la signalisation de récepteurs et perturber la réponse du neurone à différents facteurs extracellulaires comme les facteurs neurotrophiques essentiels au guidage de l'axone, à l'établissement et la maintenance des connexions synaptiques, au maintien de l'homéostasie et à la survie neuronales et/ou perturber le processus d'évacuation des déchets toxiques par autophagie et ainsi contribuer à leur dégénérescence.

LES PARAPLÉGIES SPASTIQUES HÉRÉDITAIRES (PSH)

Gène	Protéine	Localisation	Rôle dans le trafic endo-lysosomal	Référence
<i>SPG3A</i>	atlastin-1	endosomes précoces et tardifs; colocalisation avec Rab5, Rab7, Clathrin et AP-2	Potentiel régulateur de la fission des tubules endosomaux aux points de contacts avec le RE? Régle le trafic des récepteurs aux BMPs	Zhu et al., 2006; Fassier et al., 2010; Zhao and Hedera, 2013
<i>SPG4</i>	spastin	recruté sur les endosomes via son interaction avec des membres du complexe ESCRHIII	Fission des tubules endosomaux de recyclage; Recyclage des récepteurs à la transferrin	Allison et al., 2013
<i>SPG6</i>	NIPA1	membrane plasmique, endosomes précoces, tardifs et lysosomes	Régule l'internalisation des récepteurs aux BMPs dans les endosomes et leur trafic vers le lysosome	Tsang et al., 2009
<i>SPG8</i>	Strumpellir	endosomes précoces (Rab5 et EEA1 positifs) et endosomes de recyclages (Rab4, Rab11)	Composant du complexe WASH, essentiel à la fission des tubules endosomaux Régule le trafic endosomal des récepteurs au LDL et les récepteurs β-II adrénérgiques	Derivery et al., 2009; Freeman et al., 2013; Bartuzi et al., 2016
<i>SPG10</i>	KIF5A	colocalisation avec Rab11 au niveau d'endosomes de recyclages	Moteur moléculaire, rôle potentiel dans le recyclage de certains récepteurs	Matsuzaki et al., 2011
<i>SPG11</i>	spatacsin	endosomes, lysosomes	Interagit avec les protéines du manteau AP-5; Régulation de la morphologie des endosomes, lysosomes; rôle dans le trafic endolysosomal et le renouvellement lysosomal par autophagie	Chang et al., 2014; Hirst et al., 2015; Varga et al., 2015
<i>SPG15</i>	spastizin	endosomes, lysosomes	Interagit avec les protéines du manteau AP-5; Régulation de la morphologie des endosomes, lysosomes; rôle dans le trafic endolysosomal et le renouvellement lysosomal par autophagie	Khundadze et al., 2013; Chang et al., 2014; Hirst et al., 2015; Varga et al., 2015
<i>SPG20</i>	spartin	endosomes précoces et tardifs; recruté via son interaction avec la protéine adaptatrice Eps15	Dégradation endocytique des récepteurs à l'EGF et des récepteurs aux BMPs	Bakowska et al., 2007; Edwards et al., 2009; Nahm et al., 2013
<i>SPG21</i>	maspardin	Trans-Golgi, endosomes	Potentiel rôle dans la sortie des endosomes et la voie de recyclage	Simpson et al., 2003
<i>SPG33</i>	protrudin	endosomes précoces (EEA1 positifs), endosomes de recyclages (Rab11 positifs)	Potentiel rôle dans le trafic endosomal notamment la voie de recyclage; translocation des endosomes tardifs via la kinesin 1	Mannan et al., 2006; Shirane Nakayama, 2006; Matsuzaki et al., 2011; Raiborg et al., 2015
<i>SPG47</i>	AP4B1	TGN, endosomes	Sous-unité du manteau AP-4; trafic antérograde entre le TGN et les endosomes Contrôle la sortie de cargos spécifiques du TGN vers les endosomes	Park and Guo, 2014; Hirst et al., 2015
<i>SPG48</i>	AP5Z1	colocalisation avec les endosomes tardifs et les lysosomes	sous unité du manteau AP-5, potentiel rôle dans l'acheminement de cargos spécifiques vers la voie dégradative et potentiellement l'autophagie	Hirst et al., 2013, 2015
<i>SPG50</i>	AP4M1	TGN, endosomes	Sous-unité du manteau AP-4; trafic antérograde entre le TGN et les endosomes Contrôle la sortie de cargos spécifiques du TGN vers les endosomes	Park and Guo, 2014; Hirst et al., 2015
<i>SPG51</i>	AP4E1	TGN, endosomes	Sous-unité du manteau AP-4; trafic antérograde entre le TGN et les endosomes Contrôle la sortie de cargos spécifiques du TGN vers les endosomes	Park and Guo, 2014; Hirst et al., 2015
<i>SPG52</i>	AP4S1	TGN, endosomes	Sous-unité du manteau AP-4; trafic antérograde entre le TGN et les endosomes Contrôle la sortie de cargos spécifiques du TGN vers les endosomes	Park and Guo, 2014; Hirst et al., 2015
<i>SPG53</i>	VPS37A	endosomes tardifs, lysosomes	Membre du complexe ESCRT-I; trafic endosomal des récepteurs à l'EGF vers le lysosome	Bache et al., 2004
<i>ASL2</i>	alsin	endosomes précoces Rab5 positifs	Facteur d'échange du GDP en GTP pour la petite protéine G Rab5 Rôle dans la fusion des endosomes médiée par Rab5	Chandran et al., 2007; Hadano et al., 2007, 2010
<i>LYST</i>	LYST	endo-lysosomes	Régule l'identité et la taille de compartiments endo-lysosomaux	Barrett and Hermann, 2016; Gil-Krzewska et al., 2016

TABLE 4 – Les 18 protéines de PSH impliquées dans le trafic endo-lysosomal. Tableau indiquant la nomenclature des gènes responsables de PSH, les noms des protéines correspondantes, leur localisation sub-cellulaire et leur rôle putatif ou avéré dans le trafic endo-lysosomal.

IV.A.2 Défaut de morphogénèse du réticulum endoplasmique

Etonnamment, plus de la moitié des cas de PSH sont liées à des mutations dans des gènes (*SPG3A*, *SPG4*, *SPG12*, *SPG31* et *SPG33*) codant des partenaires d'interaction, localisés au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique, et qui semblent jouer un rôle essentiel dans la morphogénèse des tubules de cet organite. Le réticulum endoplasmique (RE) est un organite membranaire en continuité avec l'enveloppe nucléaire, constitué de feuillettes plats recouverts de ribosomes que l'on appelle RE rugueux (RER) et d'un réseau polygonal de tubules courbes et interconnectés qui constitue le RE lisse (REL). Le RE s'étend à travers tout le cytoplasme des cellules, et ce même au sein de l'axone et jusque dans le cône de croissance des neurones (Goyal and Blackstone, 2013). Cette organisation structurelle du RE est extrêmement conservée au cours de l'évolution et intimement liée à la spécificité fonctionnelle de ses différents compartiments. En effet, le RER joue un rôle crucial dans la synthèse, la modification post-traductionnelle, le contrôle qualité et le trafic des protéines membranaires et solubles destinées à la sécrétion. Le REL, quant à lui, est principalement impliqué dans la synthèse et la distribution des lipides, les métabolismes des carbohydrates, la détoxification, la formation des gouttelettes lipidiques et l'établissement de contacts avec d'autres organites comme les endosomes et les mitochondries régulant ainsi leur plasticité et fonctionnalité (Friedman *et al.*, 2011; Raiborg *et al.*, 2015). L'atlastin-1 codée par le gène *SPG3A* est la première protéine de PSH dont le rôle s'est révélé essentiel à la morphogénèse des tubules du RE *in vitro* comme *in vivo*. L'atlastin-1 est une GTPase transmembranaire majoritairement exprimée dans le système nerveux central. Dans des neurones de mammifères, l'atlastin-1 est majoritairement localisée au niveau des tubules du RE, et retrouvée de façon plus discrète au niveau des endosomes (Zhu *et al.*, 2006). La perte de fonction partielle (ou *knockdown*) de l'atlastin-1 altère la formation et la croissance de l'axone de ces neurones (Zhu *et al.*, 2006). Chez la drosophile, le *knockdown* ou la surexpression de l'atlastin-1 conduisent respectivement à une fragmentation ou à une expansion des membranes du RE (Orso *et al.*, 2009). En outre, la surexpression de cette GTPase sauvage ou porteuse d'une mutation à effet dominant négatif chez la levure ou dans des cellules de mammifères affecte la morphologie des tubules du RE (Hu *et al.*, 2009). Des expériences *in vitro* ont permis de montrer que l'atlastin-1 contrôle la fusion homotypique des tubules du RE nécessaire à la formation des jonctions à trois voies caractéristiques

LES PARAPLÉGIES SPASTIQUES HÉRÉDITAIRES (PSH)

de l'organisation polygonale du REL (Orso *et al.*, 2009). Ce processus est dépendant de son activité GTPase et de ces domaines transmembranaires en épingle à cheveux. Au sein de la membrane du RE, l'atlastin-1 interagit via ces domaines transmembranaires avec quatre autres protéines de PSH dont deux fréquemment impliquées dans les PSH-AD, la spastin (*SPG4*), REEP1 (*SPG31*), reticulon 2 (*SPG12*) et la protrudin (*SPG33*; Figure 12; Park *et al.*, 2010; Montenegro *et al.*, 2012; Chang *et al.*, 2013).

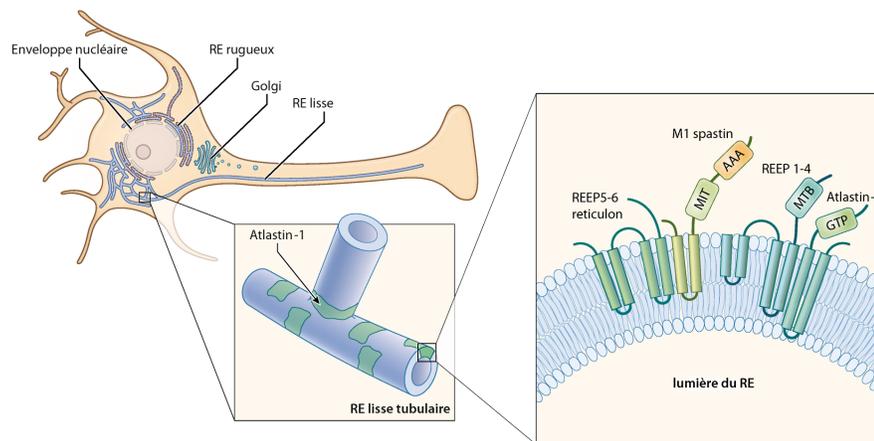


FIGURE 12 – **Spastin, atlastin-1, REEP1-4 et reticulon interagissent au sein du Réticulum Endoplasmique (RE).** Schéma représentant le réseau du RE au sein d'un neurone (à gauche), un grossissement d'une jonction à trois voies au niveau de la partie tubulaire du RE (au centre), et un encart (à droite) proposant un modèle d'interaction entre les protéines de PSH régulant la morphologie du réseau du RE. D'après Blackstone, 2012.

REEP1 et reticulon 2 sont des membres de la superfamille de protéines reticulon/REEP/Yop1p qui sont requis dans la formation et la courbure des tubules du RE. La protrudin semble, elle, influencer la morphogénèse du RE en régulant la balance entre les feuillettes et les tubules ainsi que la densité des interactions entre les tubules (Chang *et al.*, 2013). En outre, par leur capacité à interagir avec les microtubules, REEP1 et la spastin sont nécessaires à l'interaction et à l'alignement des tubules du RE avec ces polymères, ce qui s'avère crucial pour le maintien de la morphologie et la distribution spatiale du RE. En effet, l'expression d'une protéine REEP1 porteuse d'une mutation pathogène délétant sa région C-terminale ou d'une version de la spastin dépourvue de son activité ATPase altère l'organisation du RE dans des cellules HeLa (Park *et al.*, 2010; Lumb *et al.*, 2012). De plus,

chez les souris mutantes *REEP1*, la dégénérescence axonale des neurones pyramidaux à l'origine du déclin de leurs performances locomotrices s'accompagne d'une diminution de la complexité du réseau tubulaire du RE (Beetz *et al.*, 2013). Cependant, aucune évidence fonctionnelle ne permet à ce jour d'établir un lien direct entre cette altération de la morphogénèse du RE et la dégénérescence des faisceaux cortico-spinaux. Néanmoins, de façon intéressante, la protéine REEP1 a été récemment identifiée comme une protéine facilitant l'établissement de points de contact entre le RE et les mitochondries, qui permettent de réguler la fission des membranes mitochondriales et sont ainsi essentiels à leur fonctionnalité (Klecker *et al.*, 2014; Krols *et al.*, 2016). Dans ce sens, une étude récente du groupe d'Evan Reid montre que la spastin facilite la fission des tubules endosomaux au niveau de point de contact avec le RE (E Reid, communication au SPATAX meeting, Paris, juin 2016). Cette interconnection entre le RE et divers organites, comme les endosomes et les mitochondries, suggère que le dysfonctionnement de certains organites incriminés dans la pathogénèse des PSH pourrait avoir comme origine une altération même subtile de la morphologie du RE.

Enfin, d'autres protéines de PSH, moins étudiées à ce jour, sont également localisées au niveau RE comme la seipin (*SPG17*), SPFH2 (*SPG18*), ARL6IP1 (*SPG61*), l'erin-1 (*SPG62*) ou RAB3GAP2 (*SPG69*) et joueraient un rôle putatif dans la morphogénèse du RE, le système ERAD de dégradation et de contrôle qualité du RE ou encore la régulation du métabolisme lipidique. Cependant, les mécanismes moléculaires par lesquels leur dysfonctionnement conduit à la dégénérescence des faisceaux cortico-spinaux demeurent obscurs (Tesson *et al.*, 2015).

IV.A.3 Altération du métabolisme lipidique

La dérégulation du métabolisme lipidique se retrouve également au cœur de la physiopathologie des PSH avec un nombre en constante progression de gènes codant des protéines impliquées dans le métabolisme des phospholipides, sphingolipides, acides gras ou encore dans l'homéostasie des gouttelettes lipidiques (Lamari *et al.*, 2013). Par exemple, DDHD1 (*SPG28*) and DDHD2 (*SPG54*) sont deux phospholipases de type A1 tandis ce que la protéine NTE (*SPG39*; Neuropathy Target Esterase) est une phospholipase de type B qui possède à la fois une activité phospholipase A1 et

A2. D'autres protéines de PSH catalysent l'hydroxylation de l'acide arachidonique et d'acides gras à longues chaînes (CYP2U1; *SPG56*) ou la 2-hydroxylation des galactolipides de la myéline, de la galactosylceramine et du sulfatide. Enfin CYP7B1 (*SPG5A*), assez fréquemment altérée dans les PSH-AR, est une enzyme fortement exprimée dans le foie et le système nerveux où elle catalyse l'hydroxylation du 25- et 27-hydroxycholestérol. Les patients déficients en CYP7B1 présentent une augmentation anormale du taux de 27-hydroxycholestérol dans le liquide céphalo-rachidien (Schüle *et al.*, 2010). Parallèlement, CYP7B1 semble également jouer un rôle dans le métabolisme de la DHEA (dehydroepiandrosterone) dans le cerveau. En outre, de nombreuses protéines de PSH (dont les protéines majoritaires spastin, atlastin-1 et REEP1) se sont récemment révélées capitales dans la régulation de l'homéostasie des gouttelettes lipidiques (ou LD pour Lipid Droplets), des organites dédiés au stockage des lipides neutres et dérivant des tubules du RE. Parmi ces protéines, on retrouve les protéines impliquées dans la morphogénèse du RE et/ou le trafic endosomal comme l'atlastin-1 (*SPG3A*), la spastin (*SPG4*), REEP1 (*SPG31*), la seipin (*SPG17*), la spartin (*SPG20*) ou la kinesin-1 (*SPG10*) (Welte, 2015). En effet, des dérégulations de l'expression de la spastin, l'atlastin-1 ou la spartin sont associées à des modifications de la taille et du nombre de gouttelettes lipidiques ainsi qu'à une altération des taux de triglycérides *in vitro* dans des cellules non-neuronales et *in vivo* chez différents modèles animaux (Klemm *et al.*, 2013; Papadopoulos *et al.*, 2015; Eastman *et al.*, 2009; Renvoisé *et al.*, 2012). De plus, lorsqu'elle est co-exprimée avec l'atlastin-1, la protéine REEP1 augmente également la taille des gouttelettes lipidiques. La Seipin est une protéine intégrale de la membrane du RE, présente aux points de jonction entre le RE et les gouttelettes lipidiques, qui jouerait un rôle clé dans la formation et la maintenance de ces compartiments de stockage lipidique (Fei *et al.*, 2011; Cartwright and Goodman, 2012). En outre, le moteur moléculaire kinesin-1 a été impliqué dans le transport des gouttelettes lipidiques chez la drosophile (Shubeita *et al.*, 2008). Enfin, on peut supposer que le dysfonctionnement des enzymes du métabolisme lipidique, telles CYP7B1, DDHD1 et 2 etc. a un impact sur l'approvisionnement et la composition lipidique de ces gouttelettes mais cette hypothèse reste à démontrer expérimentalement.

Cependant, bien que de nombreux arguments suggèrent une contribution importante du métabolisme lipidique à la pathogénèse des PSH, les mécanismes pathogéniques par lesquels le dysfonctionnement de ce métabolisme ou l'altération des gouttelettes lipidiques perturbe l'homéostasie des faisceaux cortico-spinaux restent à élucider. Toutefois, il est fort probable que cette perturbation ait un impact direct sur la transduction des signaux médiés par les acides gras (comme les signalisations liées aux petites protéines G par exemple) ou encore les rigidité, fluidité et/ou plasticité des membranes lipidiques, qui constituent des propriétés essentielles au remodelage morphologique et par ce biais à la fonctionnalité de certains organites comme les endosomes ou le RE.

IV.A.4 Altération du transport axonal

L'identification de mutations dans les gènes *KIF5A* (*SPG10* ; Reid *et al.*, 2002), *KIF1A* (*SPG30* ; Erlich *et al.*, 2011) et *KIF1C* (*SPG58* ; Novarino *et al.*, 2014) codant des moteurs moléculaires de la famille des kinesins prouve que l'altération du trafic membranaire et/ou du transport axonal est une cause primaire de la dégénérescence axonale des faisceaux cortico-spinaux. En effet, dans les neurones, le transport actif de cargos se fait grâce à des moteurs moléculaires, ou plus précisément des enzymes qui utilisent l'énergie fournie par l'hydrolyse de l'ATP (dont la principale source est la mitochondrie) pour pouvoir se déplacer le long du cytosquelette de microtubules. On distingue deux types de moteurs moléculaires capables de transporter des cargos sur de longues distances le long des microtubules : les kinesins et la dynein. Les kinesins sont des protéines motrices qui se déplacent vers les bouts « plus » des microtubules et transportent des cargos tels que les précurseurs des vésicules synaptiques, des organites ou encore des neurofilaments de manière antérograde, depuis le corps cellulaire vers la synapse. Réciproquement, le complexe moteur dynein se déplace vers les bouts « moins » des microtubules et est responsable du transport rétrograde de certains cargos tels que des organites, des facteurs neurotrophiques, de la synapse vers le corps cellulaire. La myosin V est un moteur moléculaire qui permet le déplacement de cargos et d'organites sur des distances plus courtes, le long des filaments d'actine (Figure 13 ; Guzik and Goldstein, 2004; Chevalier-Larsen and Holzbaur, 2006).

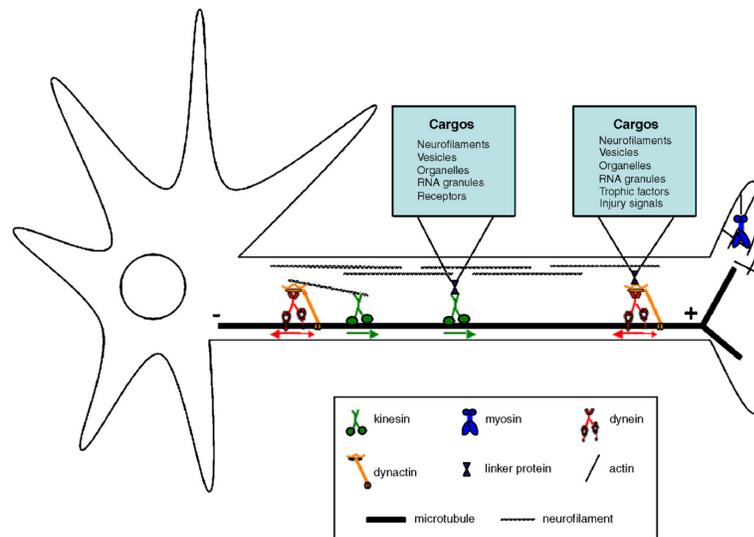


FIGURE 13 – **Les moteurs moléculaires.** La famille des kinesins est responsable du transport antérograde des cargos depuis le noyau vers la synapse. La dynein, assistée par la dynactin, permet le transport rétrograde des cargos de la synapse vers le soma. Ces moteurs moléculaires transportent leurs cargos sur de longues distances en utilisant les rails que forment les microtubules. La myosin V assure les déplacements de cargos sur de plus courtes distances, le long des filaments d'actine. Extrait de Chevalier-Larsen and Holzbaur 2006.

Le gène *KIF5A* (*SPG10*), responsable de formes pures ou complexes de PSH-AD (Reid *et al.*, 2002), code une sous unité motrice de la kinesin-1 ou kinesin conventionnelle, spécifiquement exprimée dans les neurones. Le complexe moteur des kinesins est un complexe hétérotétramérique constitué de deux sous-unités motrices de 120 kDa appelées chaînes lourdes de kinesin (KHC) et de deux sous-unités d'environ 60 kDa nommées chaînes légères de kinesin (KLC) (Bloom and Goldstein, 1998). Les chaînes lourdes de kinesins possèdent un domaine moteur qui est impliqué dans l'interaction avec les microtubules et dans l'hydrolyse d'ATP nécessaire au mouvement du complexe protéique le long des microtubules. Les chaînes légères sont, elles, impliquées dans la liaison des cargos et semblent moduler l'activité des chaînes lourdes. La kinesin-1 joue un rôle essentiel dans le transport antérograde rapide des organites membranaires (Goldstein and Yang, 2000; Goldstein, 2001) et dans le transport plus lent des neurofilaments à l'intérieur de l'axone (Xia *et al.*, 2003). En outre, la surexpression d'une forme pathogène de *KIF5A* chez la drosophile est associée à une altération du transport axonal qui se manifeste par la présence d'axones moteurs dilatés et gorgés de cargos, couplée à la diminution de l'activité locomotrice et de la survie de ces mouches (Füger *et al.*, 2012). En 2008, une étude

moléculaire utilisant des systèmes reconstitués *in vitro* a montré que des mutations pathogènes de *KIF5A*, responsables de PSH et localisées dans le domaine moteur, réduisent considérablement la processivité de ce moteur (i.e., la vitesse de glissement sur les microtubules) ou son affinité pour ces polymères (Ebbing *et al.*, 2008). Dans les deux cas, ces mutations auraient donc pour effet de réduire le flux brut de cargos et affecteraient secondairement l'homéostasie de l'axone suite à un défaut d'approvisionnement de la synapse (Ebbing *et al.*, 2008).

Les gènes *KIF1A* (*SPG30*) et *KIF1C* (*SPG58*), tous deux responsables de PSH-AR pures ou complexes, codent des moteurs moléculaires appartenant à la famille de la kinesin-3. La protéine KIF1A a été impliquée dans le transport antérograde des précurseurs vésiculaires (Okada *et al.*, 1995) en lien avec la protéine adaptatrice Rab3a (Niwa *et al.*, 2008). Les souris *knockout KIF1A* meurent peu de temps après leur naissance et présentent une réduction significative du nombre de vésicules synaptiques associée à une mort neuronale (Yonekawa *et al.*, 1998). Très récemment, le groupe de Nobutaka Hirokawa a démontré que l'haploinsuffisance de KIF1A est à l'origine d'une axonopathie périphérique chez la souris mutante KIF1A, caractérisée par une perte progressive des neurones des ganglions des racines dorsales exprimant le récepteur au NGF (Nerve Growth Factor) TrkA, et couplée à une altération du transport axonal de TrkA. De plus, leurs travaux révèlent que KIF1A lie des vésicules marquées par TrkA via la protéine Rab3a, ce qui suggère un rôle majeur de cette protéine dans le transport de ces récepteurs, une hypothèse qui pourrait expliquer le défaut de survie de ces « longs » neurones (Tanaka *et al.*, 2016). Enfin, une étude récente chez *Cænorhabditis elegans* a mis en évidence un rôle de KIF1A/UNC-104 dans la formation des autophagosomes au niveau de la synapse, via sa capacité à réguler le transport axonal d'une protéine clé de l'autophagie, ATG-9 (Stavoe *et al.*, 2016). De façon notable, le processus d'autophagie a déjà été incriminé dans d'autres formes de PSH liées à un défaut de trafic endo-lysosomal, comme les PSH liées aux loci *SPG11* et *SPG15* (Chang *et al.*, 2014; Varga *et al.*, 2015). La protéine motrice KIF1C est connue pour réguler les podosomes, des structures d'adhésions riches en actine qui remodelent la matrice extra-cellulaire

sous certaines conditions physiologiques (Efimova *et al.*, 2014). Néanmoins, une étude menée dans l'équipe de Casper Hoogenraad montre que KIF1C interagit avec BICDR-1, une protéine liant Rab6 et participe au transport bidirectionnel de vésicules sécrétoires pendant les étapes précoces de la différenciation neuronale (Schlager *et al.*, 2010).

De façon importante, les mutations d'autres gènes de PSH ne codant pas des moteurs moléculaires semblent également avoir des conséquences dramatiques, et plus ou moins directes, sur l'homéostasie du transport axonal, en altérant d'autres acteurs importants de ce trafic comme les rails de microtubules, les mitochondries, principal fournisseur d'ATP, ou encore les oligodendrocytes. C'est le cas par exemple de la spastin, une enzyme de cassure des microtubules dont la perte de fonction conduit à une stabilisation anormale du réseau de microtubules dans les axones, associée à des anomalies de transport axonal antérograde et rétrograde (Tarrade *et al.*, 2006; Kasher *et al.*, 2009; Denton *et al.*, 2014). En effet, les souris *knockout spastin* développent une axonopathie progressive caractérisée par la présence de dilatations axonales gorgées d'organite et de neurofilaments, suggérant un défaut de transport axonal (Figure 14; Tarrade *et al.*, 2006). Des dilatations axonales similaires, gorgées d'organites, sont également observées dans des cultures primaires de neurones corticaux de ces souris et peuvent être sauvées avec des drogues modulant spécifiquement la dynamique des microtubules (Fassier *et al.*, 2013). De plus, les souris *knockout SPG7* présentent de la même manière des dilatations axonales au niveau de leur moelle épinière, déficiente en paraplegin, une protéine chaperone de la membrane mitochondriale interne. Chez ces souris, le processus dégénératif couplé à des anomalies de transport axonal est précédé par des altérations morphologiques des mitochondries au niveau des terminaisons synaptiques des axones moteurs (mitochondries difformes et hypertrophiques) et par une phosphorylation oxydative anormale, suggérant qu'un déficit d'énergie au niveau des terminaisons axonales pourrait perturber le transport le long des axones et conduire à leur dégénérescence dans les PSH liées au gène *SPG7* (Figure 14; Ferreira *et al.*, 2004). De façon inattendue, les souris *knockout* pour le gène *PLP* (*SPG2*), muté dans une forme sévère de PSH-X et codant le constituant majeur de la gaine de myéline *PLP*, développent elles aussi une axonopathie associée à un défaut de transport axonal antérograde et rétrograde dans la région paranodale (Figure 14; Edgar *et al.*, 2004), découvrant pour la première fois le rôle essentiel de la communication entre l'axone et la cellule gliale

dans la régulation du transport axonal. Par ailleurs, la protéine PLP est fortement enrichie au niveau des endosomes tardifs durant la phase active de myélinisation, et des études récentes suggèrent qu'un défaut de trafic endosomal de cette protéine dans les oligodendrocytes pourrait contribuer à la pathogénèse des PSH (Shen *et al.*, 2016).

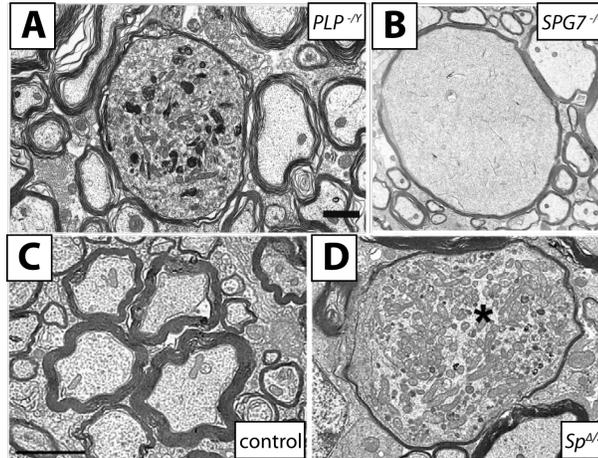


FIGURE 14 – **Les dilatations axonales des souris *knockout* *SPG2*, *SPG4* et *SPG7*.** Le phénotype de dilatation axonale est présent dans différents modèles murins de PSH. **(A)** Coupe transversale de la moelle épinière d'une souris *PLP*^{-/-}. Les dilatations axonales contiennent de nombreux organites. On note également un affinement de la gaine de myéline due à l'élargissement de l'axone. **(B)** Coupe transversale de la moelle épinière d'une souris *SPG7*^{-/-}. Des dilatations axonales sont également observées chez les souris déplétées en paraplegin, une protéine chaperonne de la membrane mitochondriale interne. **(C,D)** Coupes transversales de la moelle épinière d'une souris contrôle (C) et *Sp*^{Δ/Δ} (D). Les souris *Sp*^{Δ/Δ} présentent des dilatations axonales (D, astérisque), suggérant un défaut de transport axonal. Extraits de Griffiths *et al.* 1998; Ferreira *et al.* 2004; Tarrade *et al.* 2006.

IV.A.5 Dysfonctionnement mitochondrial

Comme on pouvait le supposer, au vu de l'importance des mitochondries dans le fonctionnement du système nerveux et de leur implication dans un grand nombre de maladies neurodégénératives telles que l'ataxie de Friedrich, les CMT de type 2A, la SLA ou la maladie de Parkinson (Kwong *et al.*, 2006; Petrozzi *et al.*, 2007), le dysfonctionnement mitochondrial compte parmi les mécanismes pathogéniques à l'origine de certaines formes génétiques de PSH. Des mutations du gène *SPG7*, codant la paraplegin, une métalloprotéase de la membrane mitochondriale interne (m.m.i) sont

LES PARAPLÉGIES SPASTIQUES HÉRÉDITAIRES (PSH)

responsables d'une forme relativement fréquente de PSH-AR associée à une atrophie optique et à une neuropathie périphérique (Casari and Rugarli, 2001; Wilkinson *et al.*, 2004). La paraplegin forme un complexe avec la protéine AFG3L2 qui est l'équivalent chez les mammifères de la protéase m-AAA de levure, impliquée dans le contrôle qualité des protéines au niveau de la m.m.i et chargée d'éliminer les protéines non assemblées ou mal repliées (Rugarli and Langer, 2006). Cependant, cette protéase m-AAA a également été impliquée dans l'assemblage des ribosomes et la régulation de la traduction protéique au niveau de la m.m.i, notamment de protéines essentielles à l'assemblage et au fonctionnement des complexes de la chaîne respiratoire (Nolden *et al.*, 2005; Rugarli and Langer, 2006). Dans les fibroblastes de patients *SPG7*, ce complexe paraplegin/AFG3L2 est anormal, ce qui conduit à une diminution de l'activité du complexe I de la chaîne respiratoire et à une augmentation de la sensibilité au stress oxydatif (Casari *et al.*, 1998; Atorino *et al.*, 2003). De plus, l'absence de paraplegin chez la souris affecte la morphologie et le fonctionnement des mitochondries le long des axones et conduit à une altération du transport axonal et à la dégénérescence de l'axone (Figure 15 ; Ferreirinha *et al.*, 2004).

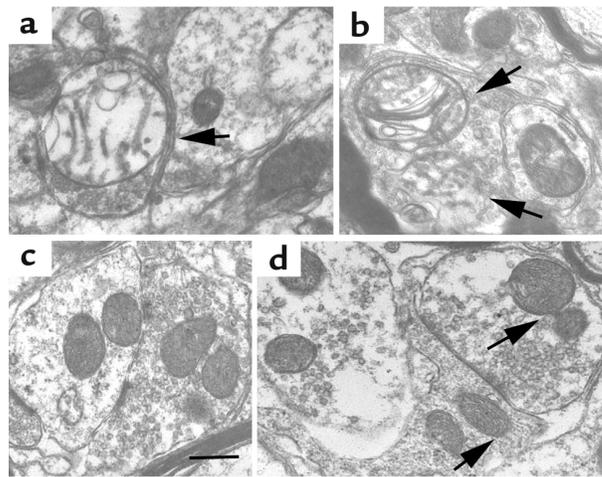


FIGURE 15 – **Défauts mitochondriaux des souris *knockout SPG7*.** (a,b) Coupes, au niveau lombaire, de la moelle épinière d'une souris mutante *SPG7*, présentant des mitochondries élargies dont les crêtes sont endommagées (flèches). (c,d) Coupes comparables d'une souris contrôle ne présentant pas de défaut mitochondrial. Extrait de Ferreirinha *et al.* 2004.

Le gène *SPG13* responsable d'une forme pure de PSH-AD à début tardif code la protéine chaperone mitochondriale HSP60, dont le dysfonctionnement dans des cellules de patients est associé à une forte diminution de l'expression de deux protéases mitochondriales Lon et ClpP, essentielles au contrôle qualité des protéines dans cet organelle (Hansen *et al.*, 2008). D'autres gènes comme MT-ATP6 et MT-CO3 codant chacun une sous-unité des complexes V et IV de la chaîne respiratoire ont également été incriminés dans les PSH. Par exemple, les mutations de MT-ATP6 affectent l'assemblage et la fonction du complexe V (Sánchez-Ferrero *et al.*, 2012). Ainsi, l'altération de ces protéines associées au bon fonctionnement de la chaîne respiratoire va probablement perturber l'homéostasie de processus cellulaires dépendant de la production d'ATP, comme le transport axonal, et être à l'origine d'un stress oxydatif. Enfin, les points de contacts entre la mitochondrie et le RE jouent un rôle clé dans la régulation du métabolisme lipidique, de la signalisation calcique, de la dynamique des membranes mitochondriales et plus récemment de l'autophagie. En outre, l'implication de ces points de contacts dans la physiopathologie de nombreuses maladies neurodégénératives comme la maladie de Parkinson, la SLA, le syndrome de Charcot-Marie Tooth, a fait l'objet de plusieurs publications récemment (Krols *et al.*, 2016). On peut donc faire l'hypothèse que des altérations des différentes protéines de PSH essentielles à la morphogénèse du RE aient un effet délétère sur le fonctionnement mitochondrial, ce qui contribuerait au déclenchement ou à la progression de la dégénérescence axonale.

IV.A.6 Altération de la gaine de myéline

Les oligodendrocytes et plus particulièrement la gaine de myéline qu'ils produisent jouent un rôle essentiel dans l'homéostasie axonale en contrôlant, entre autres, le transport axonal de cargos comme en témoigne la souris *knockout* pour la protéine PLP (Edgar *et al.*, 2004), un constituant majeur de la gaine de myéline impliqué dans une forme sévère de PSH-X (Saugier-Weber *et al.*, 1994).

Depuis la caractérisation du modèle murin *PLP*, deux autres protéines impliquées dans des formes complexes de PSH-AR, FA2H et la connexin47 (*SPG35* et *SPG44*), sont exprimées dans les oligodendrocytes et contrôlent le maintien de la gaine de myéline autour des axones du système nerveux central (SNC). La protéine FA2H est une mono-oxygénase dépendante de NADPH qui participe à la synthèse d'acides gras essentiels à la composition et à la stabilisation de la gaine de myéline. La connexin 47 est, elle, un composant des petits canaux intercellulaires tubulaires (ou connexon) présents au niveau des jonctions communicantes reliant les cytoplasmes des oligodendrocytes et des astrocytes (Orthmann-Murphy *et al.*, 2009; Potter *et al.*, 2011). Contrairement à certaines maladies neurodégénératives associées à une perte ou à une détérioration progressive de la gaine de myéline comme les leucodystrophies ou la sclérose en plaque, les PSH liées à des gènes codant des constituants de la gaine de myéline ne semblent pas associées à une démyélinisation. Cependant, ces formes rares de PSH semblent plutôt trouver leur origine dans un défaut de communication entre cette gaine isolante et l'axone, qui, à termes, induirait la dégénérescence axonale.

IV.A.7 Défaut de guidage axonal

L'identification de mutations dans le gène *L1* (*SPG1*) codant la protéine L1-CAM, une glycoprotéine transmembranaire appartenant à la superfamille des immunoglobulines et dont la fonction s'est révélée essentielle au guidage axonal des faisceaux cortico-spinaux, dans une forme de PSH-X, démontre pour la première fois qu'un défaut de développement de ces faisceaux moteurs peut être à l'origine de PSH. En effet, les souris *knockout* pour le gène *L1* ($L1^{-/Y}$) développent un phénotype similaire à celui des patients atteints de PSH liée au gène *SPG1*. Chez ce mutant, les axones des faisceaux cortico-spinaux se projettent normalement jusque dans la medulla. Cependant, au niveau de la décussation des pyramides, seule une très faible minorité d'axones, contrairement aux proportions habituelles, franchissent la ligne médiane pour croître du côté controlatéral et former le faisceau cortico-spinal latéral (Cohen *et al.*, 1998). Par la suite, Castellani *et al.* (2000) ont découvert que la protéine L1-CAM appartenait au complexe protéique composé des récepteurs Neuropilin-1 et plexinA3 du ligand Semaphorin 3A (Sema3A). Cette molécule de guidage axonal chimiorépulse est sécrétée par la moelle épinière ventrale pour repousser les axones des neurones pyramidaux en

dirigeant leur virage dorsal et leur traversée de la ligne médiane (Castellani *et al.*, 2000). En altérant la capacité des axones à répondre au signal répulsif de Sema3A, les mutations à l'origine de la perte de fonction de L1-CAM vont perturber la formation du faisceau pyramidal lors de l'embryogénèse, ce qui démontre pour la première fois l'existence d'une contribution développementale dans ces maladies neurodégénératives.

IV.B Dérégulation de voies de signalisation

Au vu de l'importance des processus cellulaires décrits ci-dessus dans la régulation du trafic membranaire de récepteurs et la signalisation intracellulaire, il n'est pas surprenant que le dysfonctionnement de plusieurs protéines de PSH s'accompagne d'une dérégulation de certaines voies de signalisation essentielles au développement embryonnaire et/ou au maintien de l'homéostasie des circuits moteurs.

Parmi les voies de signalisation dérégulées dans les différentes formes de PSH, **la voie des « Bone Morphogenetic proteins » (ou BMP)** semble occuper une place prépondérante dans la pathogénèse d'un grand nombre de ces affections. En effet, cinq protéines de PSH (incluant les deux protéines majoritaires de PSH-AD) agissent comme des inhibiteurs de la signalisation des BMPs *in vitro* et/ou *in vivo* : l'atlastin-1 (*SPG3A*), la spastin (*SPG4*), NIPA1 (*SPG6*), la spartin (*SPG20*) et PNPLA6 (*SPG39*) (Wang *et al.*, 2007; Tsang *et al.*, 2009; Fassier *et al.*, 2010; Renvoisé *et al.*, 2012; Nahm *et al.*, 2013; Song *et al.*, 2013; Zhao and Hedera, 2013; Sujkowski *et al.*, 2015; Summerville *et al.*, 2016).

IV.B.1 La signalisation des BMPs

IV.B.1.a Présentation générale Les BMPs appartiennent à la famille des TGF- β (pour Transforming Growth Factor- β) qui comprend 33 membres chez les mammifères parmi lesquelles on retrouve les TGF- β , les activins, nodal, la myostatin, etc. (Katagiri and Watabe, 2016). Parmi les membres de cette famille, 12 ont été classés dans la sous-famille des BMPs, elle-même subdivisée en quatre

groupes : le groupe BMP-2/4, les groupes OP-1 (Osteogenic Protein 1 group) comprenant BMP-5/6/7/8, le groupe des facteurs de croissance et de différenciation GDF-5/6/7 et le groupe composé de BMP-9/10. Les processus cellulaires régis par cette famille de ligands sont extrêmement variés, allant de la prolifération et de la différenciation cellulaires au cours du développement précoce, à la mise en place des tissus et au maintien de leur homéostasie. Les différents ligands BMPs se lient de manière homomérique ou hétéromérique à leur récepteur qui est lui-même un hétérotétramère constitué de deux récepteurs de type I (comprenant ALK2, ALK3 plus récemment nommé BMPRIA et ALK6 également connu sous le nom de BMPRIB) et de deux récepteurs de type II (incluant BMPRII, ACTRIIA et ACTRIIB) à activité sérine-thréonine kinase. La liaison des BMPs sur leurs récepteurs va promouvoir leur oligomérisation. Suite à cette initiation de la signalisation, les récepteurs de type II (BMPRII) transphosphorylent les récepteurs de type I (BMPRI) et activent différentes cascades de signalisations. Les BMPs exercent leurs effets cellulaires par le biais de deux grandes voies de signalisation : la voie dite **canonique**, qui passe par la régulation transcriptionnelle de gènes cibles via l'activation des effecteurs R-SMADs (Receptor-regulated Smad) et la voie dite **non-canonique**, qui englobe de nombreux effecteurs dont la kinase LIMK1, qui module la dynamique du cytosquelette d'actine, ainsi que différents membres de la famille des MAP Kinases qui vont réguler l'expression de gènes cibles ou contrôler la dynamique du cytosquelette.

La voie canonique passe par une phosphorylation activatrice des R-Smads 1/5/8 par les récepteurs BMPRI. Une fois phosphorylés, ces effecteurs vont former un complexe avec Smad4 ou Co-Smad (common-partner of Smad) qui permettra la translocation de Co-Smad dans le noyau pour exercer son rôle de facteur de transcription et réguler l'expression de gènes cibles en s'associant avec d'autres facteurs de transcription, qu'ils soient co-activateurs ou co-répresseurs (Figure 16 ; Liu and Niswander, 2005).

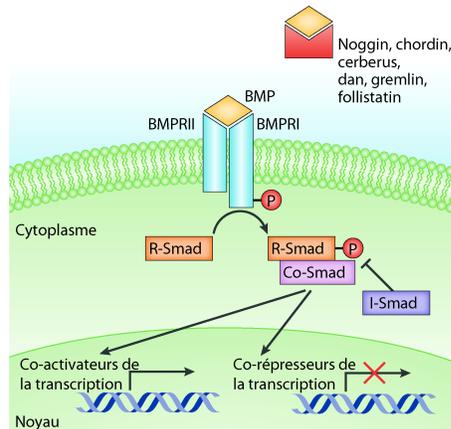


FIGURE 16 – **Voie canonique de la signalisation BMP.** La liaison des BMPs sur leurs récepteurs induit la signalisation canonique en activant le facteur de transcription Smad par phosphorylation. Une fois activé, le facteur Smad régule l’expression génique en activant ou réprimant la transcription de gènes cibles, à l’aide de partenaires tels que le co-facteur co-Smad. Modifié d’après Liu and Niswander, 2005.

En contrepartie, plusieurs voies non-canoniques distinctes et indépendantes des Smads ont été décrites. Par exemple, BMP4 est capable d’activer TAK-1, une sérine-threonine kinase de la famille des MAPKKK (MAP kinase kinase kinase) qui, par une cascade de phosphorylation, activera à son tour certaines MAP Kinases comme p38, JUNK et ERK1/2 afin de réguler l’expression de gènes cibles ou de moduler l’organisation du cytosquelette. Les BMPs agissent également par le biais d’autres effecteurs comme (i) PI3K/Akt, qui semble principalement impliqué dans la prolifération et l’apoptose, (ii) les petites Rho GTPases dont cdc42, qui participent au remodelage du cytosquelette et à la migration cellulaire ou encore (iii) la LIM Kinase 1, qui, suite à son interaction avec la longue queue cytoplasmique des BMPRII, active la cofilin, l’un des régulateurs clés de la dynamique du cytosquelette d’actine (Figure 17 ; Wang *et al.*, 2014).

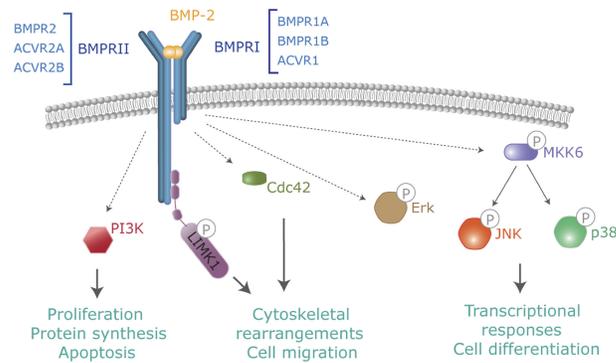


FIGURE 17 – **Voie non-canonique de la signalisation des BMPs.** Outre la phosphorylation de Smad, la fixation du ligand BMP sur les BMPR active également diverses cascades de signalisations intracellulaires telles que celles impliquant les protéines p38, PI3K, LIMK1 ou encore Cdc42. Extrait de Gámez *et al.*, 2013.

En raison de son rôle déterminant lors de différentes étapes du développement et dans la physiologie d'un grand nombre de tissus, la signalisation des BMPs doit être très finement régulée. Cette régulation va s'opérer à plusieurs niveaux :

- au niveau extracellulaire par des protéines de la matrice extracellulaires comme les HSPs (Heparan Sulfate Proteoglycans) qui limitent la diffusion du ligand et son interaction avec son récepteur (Strate *et al.*, 2015) ou par des antagonistes des BMPs, comme noggin et chordin (Walsh *et al.*, 2010).
- au niveau de la membrane plasmique par certains co-récepteurs (Corradini *et al.*, 2009).
- au niveau intracellulaire via les I-Smad (Inhibitors of Smad) qui vont bloquer l'activation des R-Smad par BMPRI, différentes phosphatases (PP1, PPA2) qui déphosphorylent les récepteurs ou les R-Smads, ou encore via d'autres protéines comme FKBP1A or FKBP12 qui inhibent l'internalisation des BMPRI en se liant à leur domaine sérine-thréonine kinase (Yao *et al.*, 2000).

Enfin, la signalisation des BMPs peut également être modulée par d'autres voies de signalisation, comme la voie Wnt (Mottier-Pavie *et al.*, 2016).

IV.B.1.b Rôle de la signalisation des BMPs dans l'établissement et la maintenance des circuits moteurs

Depuis leur découverte pour leur rôle dans la formation des os, les BMPs ont été impliqués dans un large spectre de fonctions biologiques au sein d'un grand nombre de tissus comme les cartilages, les vaisseaux sanguins, le cœur, les poumons, les reins ou encore le système nerveux. Différentes dérégulations de leur signalisation ont par ailleurs été décrites dans un grand nombre de maladies chez l'homme incluant des cancers, des pathologies inflammatoires, vasculaires, pulmonaires, osseuses ou encore certaines maladies neurodégénératives (Figure 18 ; Miyazono *et al.*, 2010; Bayat *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2014).

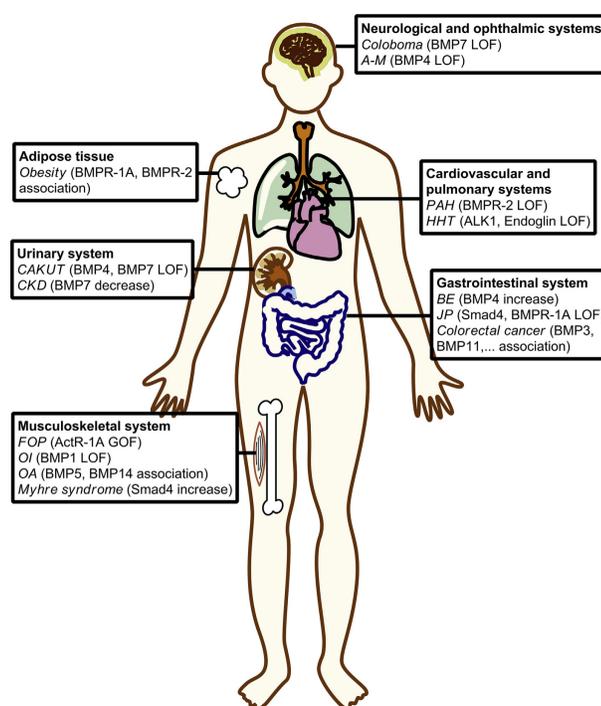


FIGURE 18 – Implication de la voie des BMPs dans diverses pathologies humaines. Sont indiqués les membres représentatifs de la voie des BMPs dont les gènes sont mutés dans des maladies génétiques affectant différents organes chez l'homme. Ces maladies sont corrélées à une hausse (GOF pour Gain of Function) ou une baisse (LOF pour Loss of Function) de l'expression du gène considéré. Abréviations : CAKUT, Congenital Anomalies of the Kidney and Urinary Tract ; CKD, Chronic Kidney Disease ; FOP, Fibrodysplasia Ossificans Progressiva ; OI, Osteogenesis Imp perfecta ; OA, Osteoarthritis ; A-M, Anophthalmia-Microphthalmia ; PAH, Pulmonary Arterial Hypertension ; HHT, Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia ; BE, Barrett Esophagus ; JP, Juvenile Polyposis. Extrait de Wang *et al.* 2014.

Au cours de cette dernière décennie, la signalisation des BMPs a été impliquée dans une multitude de processus physiologiques et pathologiques du système nerveux et s'est révélée plus particulièrement indispensable à l'établissement et au fonctionnement des circuits moteurs, influençant la croissance et le guidage des axones moteurs (Zou and Lyuksyutova, 2007; Fassier *et al.*, 2010; Bayat *et al.*, 2011), leur dégénérescence dans certaines conditions pathologiques dont les PSH (Fassier *et al.*, 2010; Bayat *et al.*, 2011; Katsuno *et al.*, 2011) et leur régénération post-lésionnelle (Zhong and Zou, 2014). En effet, il a été clairement établi qu'en plus de leur fonction classique de morphogènes au cours du développement embryonnaire précoce, les molécules de type BMP, mais également Wnt et Hedgehog, jouent un rôle plus tardif dans le guidage axonal et l'établissement des jonctions synaptiques au cours du développement du système nerveux (Charron and Tessier-Lavigne, 2005; Van Battum *et al.*, 2015). En particulier, les BMPs ont été impliqués dans le guidage des axones commissuraux de la moelle épinière chez la souris et le poulet (Butler and Dodd, 2003; Yamauchi *et al.*, 2008) ainsi que dans le guidage axonal des neurones moteurs chez le nématode (Colavita *et al.*, 1998) et l'embryon de poisson-zèbre (Fassier *et al.*, 2010). De plus, plusieurs études démontrent que les signaux BMPs sécrétés par le muscle contrôlent la croissance synaptique des neurones moteurs et la stabilisation des synapses au niveau des jonctions neuromusculaires chez la drosophile (Aberle *et al.*, 2002; Marqués *et al.*, 2002; McCabe *et al.*, 2003, 2004; Eaton and Davis, 2005). Récemment, des « modèles drosophiles » de maladies neurodégénératives affectant spécifiquement les neurones moteurs comme l'amyotrophie spinale (Chang *et al.*, 2008), la sclérose latérale amyotrophique (Ratnaparkhi *et al.*, 2008) et certaines formes de PSH (Wang *et al.*, 2007; Nahm *et al.*, 2013) ont permis de dévoiler l'influence des protéines altérées dans ces affections sur la régulation de la signalisation des BMPs au niveau de la jonction neuromusculaire. Enfin, depuis quelques années, les BMPs sont apparus comme des acteurs essentiels de la régénération axonale post-lésionnelle influençant simultanément les réponses neuronale et gliale à la suite d'une lésion du système nerveux central. En effet, les BMPs sont capables d'activer un programme transcriptionnel pro-régénératif dans les neurones via l'un des principaux effecteur de la voie canonique : Smad1. En effet, l'expression de Smad1 augmente suite à une lésion pré-conditionnée du nerf sciatique et est en outre requise pour augmenter le potentiel régénératif des neurones du système nerveux central (Zou and Lyuksyutova, 2007; Parikh *et al.*,

2011; Saijilafu *et al.*, 2013). En parallèle, les BMPs influenceraient également le microenvironnement autour de la lésion en modulant l'astroglie, la réponse inflammatoire ou encore la différenciation des progéniteurs neuronaux. Cependant, les effets de l'inhibition de la voie des BMPs *in vivo* sur la cicatrice gliale, la régénération axonale et la récupération fonctionnelle post-lésionnelle demeurent variables et très controversés, avec des conséquences bénéfiques observées uniquement dans certains cas (Xiao *et al.*, 2010; Setoguchi *et al.*, 2004; Enzmann *et al.*, 2005; Matsuura *et al.*, 2008).

IV.B.1.c Les protéines de PSH dans la régulation de la signalisation des BMPs

A ce jour, cinq protéines de PSH semblent réguler et plus précisément inhiber la signalisation des BMPs. En 2007, Wang *et al.* révèlent pour la première fois l'implication d'une protéine de PSH, la spichthyin, orthologue de la protéine NIPA1 (*SPG6*) chez la drosophile, dans la régulation de la signalisation des BMPs *in vivo*. En effet, cette étude a montré que la spichthyin est une protéine localisée au niveau des endosomes précoces et dont la perte de fonction conduit à une expansion anormale des jonctions neuromusculaires. Ce phénotype a pu être sauvé par l'inhibition génétique de la voie des BMPs. En outre, des expériences de perte et gain de fonction et de sauvetage phénotypique ont établi que la spichthyin agit comme un inhibiteur de la voie des BMPs et qu'elle exerce cette fonction en régulant le trafic endosomal des BMPRs à travers la voie d'endocytose. En effet, dans les cellules S2 de drosophile, la spichthyin interagit avec les BMPR et stimule leur internalisation dans des endosomes précoces (Wang *et al.*, 2007). Cette hypothèse sera étayée en 2009 par une étude *ex vivo* qui montre que la protéine NIPA1 inhibe la signalisation des BMPs dans des cellules de mammifères, en régulant le trafic et la dégradation des BMPRII à travers la voie d'endocytose (Tsang *et al.*, 2009). En parallèle, les auteurs montrent simultanément que le *knockdown* de la spartin (*SPG20*) ou de la spastin (*SPG4*) dans des cellules HeLa conduit à une augmentation anormale de la phosphorylation des Smads1/5/8 (les principaux effecteurs de la voie canonique des BMPs), suggérant l'implication de ces deux autres protéines de PSH dans la régulation de la voie des BMPs. Plus récemment, une analyse chez la drosophile a mis en évidence que la spartin inhibe la signalisation des BMPs en régulant la dégradation endocytaire des BMPRII et contrôle, par ce biais, la dynamique des microtubules, nécessaire à la croissance synaptique et à l'homéostasie des

neurones moteurs (Nahm *et al.*, 2013). En outre, une augmentation modérée de la signalisation des BMPs a été observée dans les fibroblastes des souris *knockout* pour la spartin (Renvoisé *et al.*, 2012). En parallèle de ces travaux, notre équipe a révélé le rôle critique de l'atlastin-1 (*SPG3A*) dans la régulation de la signalisation des BMPs, essentielle au guidage axonal des neurones moteurs spinaux et à la mobilité des larves de poisson-zèbre (Fassier *et al.*, 2010). Cette GTPase membranaire pourrait également exercer son action en régulant le trafic endosomal des récepteurs aux BMPs au vu de sa colocalisation avec BMPRI dans des endosomes précoces et tardifs le long des axones des neurones moteurs spinaux (Fassier *et al.*, 2010). Depuis, deux études ultérieures ont montré que l'atlastin-1 interagit physiquement avec la protéine NIPA1 (Botzolakis *et al.*, 2011) et que certaines mutations pathogènes de cette GTPase altèrent le trafic des BMPRII à la membrane dans des neurones corticaux de souris (Zhao and Hedera, 2013). De plus, la perte de fonction de l'atlastin-1 chez la drosophile engendre des déficits locomoteurs progressifs associés à un excès de croissance synaptique, une fragmentation du RE tubulaire au niveau des terminaisons distales des nerfs et une augmentation anormale de la signalisation des BMPs, ce qui confirme l'importance de la dérégulation des BMPs dans la pathogénèse des formes liées à *SPG3A* (Summerville *et al.*, 2016). Enfin, de façon similaire à l'atlastin-1, le *knockdown* de la protéine PNPLA6 codée par le gène *SPG39* et plus connue sous le nom de NTE (Neuropathy Target Esterase) induit des défauts de développement des neurones moteurs spinaux associés à une augmentation anormale de la signalisation des BMPs chez l'embryon de poisson-zèbre (Song *et al.*, 2013).

Toutefois, si ces études démontrent de façon convaincante l'importance des protéines de PSH dans la régulation de la voie des BMPs, il reste aujourd'hui à clarifier si l'excès de cette signalisation affecte le développement et/ou la maintenance des faisceaux cortico-spinaux chez les mammifères. De façon intéressante, les analyses fonctionnelles de la spichthyin/NIPA1 et de la spartin chez la drosophile ont permis de révéler l'importance de la signalisation des BMPs dans la régulation de la dynamique des microtubules et l'homéostasie du transport axonal dans les neurones moteurs (Wang *et al.*, 2007; Nahm *et al.*, 2013). Ces deux processus cellulaires ont été à maintes reprises incriminés dans la pathogénèse des PSH et celle d'autres maladies neurodégénératives affectant les

neurones moteurs chez l'homme et la souris. Par ailleurs, l'une de ces études identifie les protéines Futsch/MAP1B et dFMRP (dont l'orthologue humain est responsable du syndrome de l'X fragile) comme des effecteurs de la signalisation des BMPs nécessaires à la stabilisation des microtubules au sein de l'axone (Nahm *et al.*, 2013).

IV.B.2 La voie de signalisation semaphorin/neuropilin-1

Comme nous l'avons vu précédemment, la dérégulation de la signalisation semaphorin 3A/ neuropilin-1 est la cause primaire de l'atteinte des faisceaux cortico-spinaux dans les formes de PSH liées au gène *SPG1* (ou *L1*) codant la molécule d'adhérence cellulaire L1-CAM. En effet, les axones pyramidaux déficients en L1-CAM sont incapables d'intégrer le signal répulsif Sema3A et ne franchissent plus la ligne médiane au niveau de la décussation des pyramides, ce qui se manifeste d'un point vue neuropathologique par un amincissement du faisceau cortico-spinal latéral.

IV.B.2.a La signalisation Les semaphorins sont des molécules chimio-attractives ou chimio-répulsives impliquées dans la migration et le guidage axonal de certaines populations neuronales. Ces protéines de signalisation peuvent être liées à la membrane par un groupement glycosyl phosphatidyl inositol (GPI), transmembranaires ou encore sécrétées. Elles possèdent, toutes, un domaine caractéristique de 500 acides aminés, riche en résidus Cystéines et nommé domaine « Sema ». Les premiers récepteurs des semaphorins à avoir été identifiés sont les neuropilins 1 et 2 (NRP1 et NRP2). Ces derniers ont la particularité de s'associer spécifiquement aux semaphorins de classe 3. Cependant, la partie cytoplasmique de ces récepteurs étant extrêmement courte, d'autres partenaires protéiques étaient requis pour transduire le signal de ces semaphorins (Figure 19).

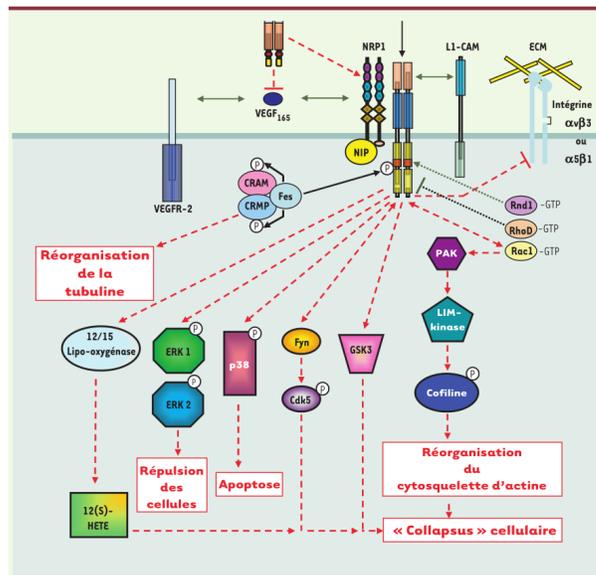


FIGURE 19 – **Représentation schématique des voies en aval de la signalisation de Sema3A et de leurs conséquences au niveau cellulaire.** Sema3A est en compétition avec le VEGF₁₆₅ (Vascular Endothelial Growth Factor 165) pour la liaison aux récepteurs neuropilins (ici NRP1). La formation du complexe ligand/récepteur favorise le recrutement ou l’activation de plusieurs molécules : NIP (NRP1-Interacting Protein), CRAM (CRMP-Associated Molecule), CRMP (Collapsin Response Mediator Protein), Fes, 12/15 lipo-oxygénase, 12(S)-HETE (12[S]- et 15[S]- Hydroperoxy-Eicosatetraenoic acid), ERK1/2 (Extracellular Regulated Kinase 1/2), p38 MAPK (p38 Mitogen Activated Protein Kinase), Fyn, Cdk5 (cyclin-dependent kinase), GSK3 (Glycogen Synthase Kinase 3), PAK (P21-Activated Kinase), LIM-kinase et Cofilin. Les différentes voies représentées (flèches en pointillés rouges) seraient impliquées dans l’apoptose induite par Sema3A mais également dans la réorganisation des cytosquelettes d’actine et de microtubules, et ainsi dans la migration cellulaire et la croissance axonale. Extrait de Nasarre *et al.* 2005.

Dans le cas de la molécule chimio-réulsive Sema3A, qui nous intéresse plus particulièrement, le récepteur impliqué dans la transduction de son signal est un complexe constitué de trois protéines : la neuropilin-1 qui lie la Sema3A, la molécule d’adhérence LI-CAM, et la plexinA4, impliquée dans l’activation de la signalisation intracellulaire. La Sema3A exerce son action répulsive par le biais de l’activation de cascades de signalisations parallèles qui vont principalement converger vers un remodelage du cytosquelette de microtubule et d’actine, impliqué dans l’effondrement du cône de croissance. En effet, une première cascade de signalisation, incluant les petites protéines G, la LIM Kinase 1 et la cofilin, conduit à un remodelage du cytosquelette d’actine. Une autre cascade de signalisation, impliquant la FAK (Focal Adhesion Kinase) et les MAPK, semble requise pour désas-

sembler les points d'adhésions présents au niveau du cône de croissance et permettre la rétraction de l'axone (Bechara *et al.*, 2008). De façon concomitante, une cascade de phosphorylation mettant séquentiellement en jeu les kinases $cdk5$ et $GSK3\beta$ entraîne la phosphorylation de la protéine CRMP2 (Collapsin Response-Mediating Protein-2), qui est essentielle à la dépolymérisation des microtubules et par ce biais à la rétraction de l'axone (Uchida *et al.*, 2005).

IV.B.2.b Implication de la signalisation Sema3A/neuropilin-1 dans la pathogénèse des PSH A ce jour, une dérégulation de la voie Sema3A/neuropilin-1 a été incriminée dans la pathogénèse d'une seule forme génétique de PSH-X et ne concerne donc que peu de patients (Jouet *et al.*, 1994; Castellani *et al.*, 2000). Cependant, la protéine L1-CAM, impliquée dans cette forme rare de PSH-X régule l'internalisation du complexe neuropilin-1/L1-CAM dans des vésicules à manteau de clathrin, un processus clé de l'effondrement du cône de croissance induit par Sema3A (Castellani *et al.*, 2004). En outre, une autre protéine, TAG-1 est nécessaire à la régulation du trafic endosomal et à la signalisation des récepteurs à la Sema3A (Dang *et al.*, 2012). Ainsi, au vu de l'importance de la voie d'endocytose et du remodelage des microtubules dans la réponse répulsive induite par cette molécule de guidage, il ne serait pas surprenant que le dysfonctionnement d'autres protéines de PSH puisse altérer cette signalisation et perturber ainsi le développement et/ou la maintenance des faisceaux cortico-spinaux. En effet, si nous avons principalement parlé du rôle de cette signalisation dans le développement du faisceau pyramidal, il est important de mentionner que cette voie joue également un rôle crucial dans l'homéostasie des neurones moteurs puisqu'elle a été récemment impliquée dans la pathogénèse de deux autres maladies neurodégénératives affectant le système moteur : des forme génétiques de SLA (Venkova *et al.*, 2014) et de CMT de type II (He *et al.*, 2015).

IV.B.3 Autres voies de signalisation ?

Deux protéines de PSH ont été impliquées dans la dégradation endocytique des récepteurs à l'EGF (EGFR, Epidermal Growth Factor Receptor) dans des cellules non neuronales : la spartin codée par *SPG20* (Tableau 4 ; Bakowska *et al.*, 2007 ; Edwards *et al.*, 2009) et vps37A codée par *SPG53* (Tableau 4 ; Bache *et al.*, 2004). En outre, les cultures primaires de neurones corticaux issues de souris *knockout* pour la maspardin (*SPG21*) révèlent une baisse significative de l'expression de certains effecteurs de la signalisation EGF/EGFR ; ce phénotype de la voie EGF peut être corrélé à l'incapacité des neurones mutants à stimuler leur croissance neuritique en réponse à un traitement à l'EGF (Davenport *et al.*, 2016). Ainsi, une dérégulation des signalisations associées aux récepteurs EGFR, faisant suite à un défaut de dégradation endocytique de ces derniers, pourrait également contribuer à la pathogénèse de certaines formes de PSH. Dans ce sens, plusieurs études ont préalablement suggéré que l'inhibition de la signalisation EGF/EGFR pourrait protéger les neurones de la dégénérescence dans certaines conditions pathologiques (Liu *et al.*, 2006 ; Erschbamer *et al.*, 2007 ; Offen *et al.*, 2009). Par ailleurs, un modèle souris de SLA (*SOD-1*) traité à l'erlotinib, un inhibiteur des EGFR utilisé dans le traitement de certains cancers, voit la progression de la neurodégénérescence freiner après traitement (Le Pichon *et al.*, 2013). De façon intéressante, la signalisation des récepteurs à l'EGF semble être régulée par la neuropilin-1. En effet, le domaine extracellulaire du récepteur neuropilin-1 a la capacité d'interagir avec EGFR et de stimuler la cascade de signalisation induite par l'EGF ou le TGF- α (Rizzolio *et al.*, 2012).

Enfin, la perte de fonction de la spastin affecte le recyclage des récepteurs à la transferrin (TfR) et conduit à la dégradation excessive de ces derniers dans les cellules HeLa (Allison *et al.*, 2013). Bien que les TfRs soient bien connus pour leur rôle dans le transport intracellulaire du fer ainsi que dans la régulation de son homéostasie, et communément utilisés comme marqueur de l'endocytose à clathrin, leur rôle dans le développement du système nerveux n'a pas été documenté. Une étude très récente révèle cependant leur implication dans la régulation du trafic endosomal des récepteurs AMPA et la plasticité synaptique (Liu *et al.*, 2016). L'invalidation conditionnelle des TfRs dans les progéniteurs neuronaux chez la souris engendre des crises d'épilepsie et réduit la transmission

synaptique basale ainsi que la potentialisation à long terme, deux conséquences physiologiques associées à un défaut de recyclage des récepteurs AMPA (Liu *et al.*, 2016). En outre, les Tfrs sont nécessaires à la transduction des signaux $TGF\beta$ et BMP au cours de la morphogénèse cranio-faciale (Lei *et al.*, 2016). On pourrait ainsi supposer que la spastin, par son influence sur le trafic des Tfrs, pourrait réguler de façon indirecte la voie des BMPs, impliquée dans la pathogénèse de cinq formes génétiques de PSH.

Chapitre II

Les PSH liées au gène *SPG4*

I Présentation clinique

I.A Hétérogénéité clinique

Les mutations du gène *SPG4* sont responsables de formes pures de PSH caractérisées par un syndrome pyramidal isolé et fréquemment associé à des dysfonctionnements sphinctériens (21% des patients) ainsi qu'à une perte de la sensibilité aux vibrations au niveau des membres inférieurs (Tallaksen *et al.*, 2001; McDermott *et al.*, 2006). Cependant, quelques formes complexes de PSH liées au gène *SPG4* ont également été décrites. Pour ces formes, les signes cliniques associés au syndrome pyramidal sont très divers mais essentiellement neurologiques et incluent des troubles épileptiques ou cognitifs (Heinzlef *et al.*, 1998; McMonagle *et al.*, 2004; Erichsen *et al.*, 2009), une ataxie cérébelleuse (Nielsen *et al.*, 2004), une atrophie du corps calleux et du vermis cérébelleux (Orlacchio *et al.*, 2004) ou encore une neuropathie périphérique (McDermott *et al.*, 2006). De façon notable, les mutations du gène *SPG4*, décrites chez des patients souffrant de PSH complexes associées à des signes cognitifs avaient été préalablement rapportées pour des formes pures de la maladie, évoquant la possibilité de

gènes modificateurs du phénotype dans cette composante psychiatrique de la maladie (Ribaï *et al.*, 2008). Toutefois, face à la rareté de ces formes complexes, il est difficile d'établir avec certitude un lien entre ces signes neurologiques additionnels et la mutation du gène *SPG4*, et il est envisageable que certains de ces signes neurologiques soient apparus de manière fortuite chez les patients.

La variabilité phénotypique inter et intrafamiliale est particulièrement prononcée dans les formes *SPG4* et concerne aussi bien l'âge de début des symptômes que la sévérité et la progression de la maladie. En effet, l'âge d'apparition des symptômes fluctue de la petite enfance à la sénescence avec une moyenne de 29 ans (Dürr *et al.*, 1996; McDermott *et al.*, 2006). Une extrême variabilité intrafamiliale de l'âge d'apparition des premiers symptômes, rapportant un écart de 50 ans sur trois générations, a été décrite dans une famille liée au gène *SPG4* (Fonknechten *et al.*, 2000), puis imputée au mosaïcisme somatique observé chez le patient fondateur et porteur d'une mutation *de novo* (Depienne *et al.*, 2007b). La sévérité des formes *SPG4* est également très hétérogène s'étendant d'une légère raideur des membres inférieurs à la nécessité d'utiliser un fauteuil roulant pour se déplacer (Tallaksen *et al.*, 2001; Solowska and Baas, 2015). En outre, la pénétrance des formes *SPG4* est incomplète et dépendante de l'âge (Dürr *et al.*, 1996; Depienne *et al.*, 2006), et il existe de 8 à 10% de porteurs asymptomatiques. De même, la progression de la maladie varie considérablement selon les individus, avec toutefois une progression plus rapide pour les formes à début tardif (Tallaksen *et al.*, 2001).

I.B Neuropathologie

La neuropathologie des formes *SPG4* est peu documentée compte tenu de la rareté des échantillons post-mortem. En 2003, une étude anatomopathologique de trois cas de PSH liées au gène *SPG4* décrivit une pâleur de la gaine de myéline aux niveaux des extrémités distales des faisceaux moteurs descendants (niveaux thoracique et lombaire) et sensoriels ascendants (niveau cervical) de la moelle épinière, confirmant la dégénérescence axonale rétrograde (Wharton *et al.*, 2003). Aucune dégénérescence, ni anomalie cytologique des corps cellulaires des neurones pyramidaux n'a été observée mais l'examen a montré une légère gliose, proportionnelle à l'étendue de la dégénérescence axonale.

De façon inattendue, il a été décrit des anomalies cytologiques au niveau des corps cellulaires des motoneurons situés dans la corne ventrale de la moelle épinière, dont des inclusions hyalines, une distribution subcellulaire anormale des mitochondries et des altérations du cytosquelette. Néanmoins, ces anomalies ne sont pas associées à une perte de ces neurones. Par ailleurs, des signes d'amyotrophie suggestifs d'une atteinte des motoneurons spinaux ont été rapportés chez plusieurs patients *SPG4* (Lindsey *et al.*, 2000; Wharton *et al.*, 2003; McDermott *et al.*, 2006). Enfin, des dilatations axonales, gorgées d'organites et de neurofilaments, ont été décrites au niveau des faisceaux cortico-spinaux et des colonnes dorsales chez deux patients de PSH liées à *SPG4* (Kasher *et al.*, 2009). Cette découverte qui confirmait chez l'homme les dilatations axonales préalablement identifiées chez un modèle murin *SPG4 knockout* (Tarrade *et al.*, 2006), a permis de démontrer l'existence d'une conservation inter-espèce des mécanismes moléculaires et cellulaires à l'origine de formes *SPG4* de PSH.

II Présentation du gène codant la spastin

II.A Le locus *SPG4*

Le gène *SPG4*, porté par le bras court du chromosome 2 (en 2p21-p22), s'étend sur une distance de 90 kilobases (kb) et est constitué de 17 exons (Hazan *et al.*, 1999). Peu de temps après sa découverte, il fut impliqué dans 40% des cas de PSH-AD (Fonknechten *et al.*, 2000). La taille des différentes régions exoniques et introniques ainsi que l'organisation des jonctions exon/intron de ce gène sont mentionnées ci-dessous (Figure 20). L'ADN complémentaire (ou ADNc) du gène *SPG4* mesure 3263 paires de base (pb) et comprend une région 5'UTR (pour UnTranslated Region) de 125 pb, un cadre de lecture ouvert (ou ORF pour Open ReadingFrame) de 1848 pb ainsi qu'une région 3'UTR de 1290 pb (Figure 20). En outre, deux sites fonctionnels d'initiation de la traduction ont été décrits chez les mammifères. Le premier, localisé en position +1 chez l'homme (Méthionine 1) est entouré d'une séquence de Kozak dégénérée bien qu'hautelement conservée, alors que le deuxième, localisé

en position +259 (Méthionine 87 chez l'homme), est entouré d'une séquence de Kozak proche de la séquence consensus et plus favorable à la traduction. Comme nous le verrons par la suite, l'utilisation différentielle de ces deux ATGs va conduire à la synthèse de deux isoformes majoritaires de spastin (Claudiani *et al.*, 2005).

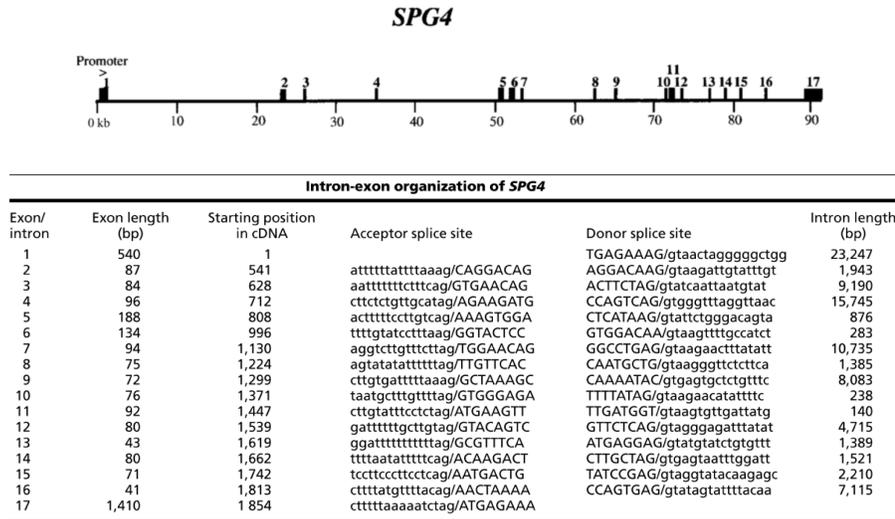


FIGURE 20 – Organisation génomique du gène *SPG4* en 17 exons et séquences de leurs sites accepteurs et donneurs d'épissage. Le gène *SPG4* couvre une région d'environ 90kb sur le bras court du chromosome 2. Les séquences introniques et exoniques sont respectivement indiquées en majuscules et minuscules. Modifié d'après Hazan *et al.* 1999.

La région 5'UTR du gène *SPG4* est extrêmement bien conservée chez les mammifères, ce qui suggère l'existence d'éléments de régulation importants. En effet, on trouve entre 82% et 100% d'homologie de séquence au niveau de cette région en 5' entre les transcrits *SPG4* humain, de chimpanzé (100%), de chien (90%), de rat (85%) ou de souris (82%; Claudiani *et al.*, 2005).

La région promotrice du gène *SPG4* est encore assez mal caractérisée à ce jour. Selon une étude récente cette dernière s'étendrait sur une distance de 700 pb et ne contiendrait pas de TATA box. En revanche, les auteurs de ces travaux décrivent la présence d'un site de liaison pour le facteur de transcription de type répresseur Elk1, et celle d'un îlot CpG dont la délétion progressive décroît graduellement l'activité du promoteur, ce qui souligne l'influence de modifications épigénétiques dans la régulation de l'expression du gène *SPG4* (Canbaz *et al.*, 2011). D'autres protéines telles

que Jagged1, un des ligands du morphogène Notch qui participe à la régulation de l'activité transcriptionnelle, ainsi que le facteur de transcription Knot ont respectivement des rôles de répresseur ou d'activateur de l'expression de *SPG4* (Jinushi-Nakao *et al.*, 2007; Ferrari-Toninelli *et al.*, 2008). Cependant, aucune preuve d'une régulation directe de ce gène n'a été décrite à ce jour. En outre, un autre élément de régulation intragénique a été identifié par le groupe d'Elena Rugarli : il s'agit d'un promoteur cryptique, localisé dans l'exon 1 et dont l'activité contrôle l'expression d'un transcrit plus court qui sera traduit à partir du second ATG (Mancuso and Rugarli, 2008). Il est important de noter que deux polymorphismes intragéniques causant des formes plus sévères et plus précoces de la maladie, lorsqu'ils sont associés avec une mutation pathogène dans le gène *SPG4*, se localisent dans cette région promotrice.

II.A.1 Épissage alternatif du transcrit *SPG4*

Des expériences de RT-PCR réalisées sur des ARNs extraits de lignées lymphoblastoïdes de patients et d'individus contrôles ont permis d'identifier trois variants d'épissages, tous plus faiblement exprimés que l'ARNm pleine longueur (Svenson *et al.*, 2001a; Charvin *et al.*, 2003). Le premier variant résulte de l'épissage alternatif de l'exon 4. Ce dernier est le plus fréquent et n'entraîne ni le décalage du cadre de lecture ni la perte d'un motif structural clé pour la fonctionnalité de la spastin. Par ailleurs, bien que plus de 200 mutations différentes aient été décrites dans le gène *SPG4*, aucune mutation ponctuelle n'affecte l'exon 4 (Svenson *et al.*, 2001a; Claudiani *et al.*, 2005). L'épissage de cet exon est un phénomène conservé au cours de l'évolution puisqu'il a été également décrit chez les rongeurs et le nématode (*C. elegans*), ce qui souligne son importance physiologique (Charvin *et al.*, 2003; Matsushita-Ishiodori *et al.*, 2007). Deux autres variants dont l'expression semble particulièrement faible, comparée à celles des transcrits pleine longueur ou épissé de l'exon 4 ont également été rapportés : un transcrit dépourvu de l'exon 8 et l'autre dépourvu de l'exon 15 (Svenson *et al.*, 2001a; Shoukier *et al.*, 2009). Contrairement à l'épissage de l'exon 15, qui engendre un décalage du cadre

de lecture et la perte de la queue C-terminale de la spastin dont une partie du domaine ATPase, l'épissage de l'exon 8 conserve le cadre de lecture mais excise une partie du domaine ATPase (Svenson *et al.*, 2001a; Shoukier *et al.*, 2009). Cependant, les protéines traduites à partir de ces transcrits épissés n'ont jamais été détectées à ce jour.

II.A.2 Patron d'expression du gène *SPG4*

Le gène *SPG4* est exprimé de façon ubiquitaire dans les tissus foetaux et adultes tant chez l'homme que chez les autres mammifères, voir chez les vertébrés en général. Cependant, son expression est très enrichie dans le système nerveux central et tout particulièrement dans le cerveau foetal (Hazan *et al.*, 1999; Charvin *et al.*, 2003). Il est intéressant de noter que le transcrit dépourvu de l'exon 4 est plus faiblement exprimé dans le cerveau de la souris contrairement au transcrit pleine longueur mais qu'en revanche l'expression de ce variant d'épissage prédomine dans certains tissus non neuronaux tels que les muscles squelettiques et le cœur (Figure 21, Charvin *et al.*, 2003).

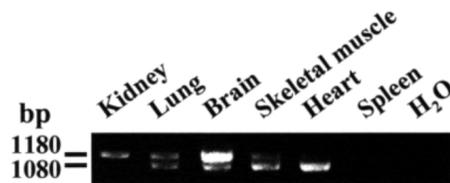


FIGURE 21 – **Épissage alternatif de l'exon 4 du gène *Spg4* dans différents tissus murins.** Le ratio entre la forme épissée et la forme pleine longueur du transcrit spastin varie selon les tissus examinés. On note que le transcrit non épissé est majoritaire dans le cerveau alors que le transcrit épissé est enrichi dans les muscles squelettiques et le cœur. Adapté de Charvin *et al.* 2003.

II.B Un spectre de mutations très vaste

Les mutations du gène *SPG4* sont responsables d'environ 20% des formes familiales de PSH et d'approximativement 40% des formes autosomiques dominantes (Fonknechten *et al.*, 2000; Lindsey *et al.*, 2000; Svenson *et al.*, 2001a; Crippa *et al.*, 2006; Magariello *et al.*, 2006). Cependant, la prévalence des mutations du gène *SPG4* dans les PSH-AD varie entre 15 et 40% selon la population étudiée (Hentati *et al.*, 2000; McDermott *et al.*, 2006; Patrono *et al.*, 2005). Les mutations du gène

SPG4 sont également fréquentes dans les formes sporadiques de paraplégies spastiques puisqu'elles concernent environ 12% des patients sans histoire familiale (Depienne *et al.*, 2006). En outre, ces mutations sont plus fréquentes dans les formes pures et sporadiques de PSH (15,5%) que dans les formes sporadiques et complexes (4,6%) (Depienne *et al.*, 2006).

II.B.1 Les mutations ponctuelles

Plus de 200 mutations hétérozygotes ont été décrites tout au long de la séquence codante du gène *SPG4*. La plupart de ces mutations sont dites « privées », c'est-à-dire retrouvées dans une seule famille. Bien que certaines mutations, aient été identifiées dans différentes familles, il n'existe pas de réelle mutation prédominante au sein du gène *SPG4* et la fréquence élevée d'une mutation dans une population donnée résulte souvent d'un effet fondateur (Tallaksen *et al.*, 2001; Meijer *et al.*, 2007). Tous les types de mutations ponctuelles ont été observées dans les formes familiales : des mutations faux-sens (28-40%, substitution d'un acide aminé par un autre), des mutations non-sens (15-18%, substitution d'un acide aminé par un codon STOP), des mutations décalant le cadre de lecture (23-30%, par insertion ou délétion d'un nucléotide) ou encore des mutations de site d'épissage (19-29%, entraînant la délétion d'un ou plusieurs exons dans la séquence) (Fonknechten *et al.*, 2000; McDermott *et al.*, 2006; Shoukier *et al.*, 2009). La fréquence de ces différents types de mutation est cependant variable avec une majorité de mutations faux-sens (74%) dans les cas sporadiques (Depienne *et al.*, 2006).

Bien que des mutations ponctuelles sont décrites tout au long de la séquence codante de *SPG4*, leur répartition n'est pas homogène et varie en fonction du type de mutations (Figure 22). De façon générale, la grande majorité des mutations ponctuelles (72,7%) et plus particulièrement la quasi-totalité des mutations faux-sens se situent entre les exons 7 à 17 de *SPG4*, dans la partie du gène codant le domaine ATPase essentiel à l'activité de la spastin (Fonknechten *et al.*, 2000; Casari and Rugarli, 2001; Shoukier *et al.*, 2009). Cependant, quelques mutations faux-sens ont également été décrites à l'extérieur de cette région (McDermott *et al.*, 2006; Crippa *et al.*, 2006; Patrono *et al.*, 2005) et affectent des acides aminés extrêmement conservés au cours de l'évolution et localisés aux

extrémités N- (p.E112K) et C-terminales (p.L195R et p.L195V) ou encore à l'intérieur (p.F124D) du domaine MIT (Microtubule-Interacting and Trafficking domain ; acides aminés 116 à 194) dont la fonction est requise au recrutement de la spastin dans certains compartiments subcellulaires spécifiques, comme les endosomes (Connell *et al.*, 2009; Allison *et al.*, 2013; Vietri *et al.*, 2015). Par exemple, la mutation p.F124D localisée au cœur du domaine MIT et très conservée au cours de l'évolution interfère avec le recrutement de la spastin au niveau des endosomes (Yang *et al.*, 2008).

Les mutations affectant les sites d'épissages impliquent, dans la majorité des cas, les introns 5 à 16 (Fonknechten *et al.*, 2000; Lindsey *et al.*, 2000; Svenson *et al.*, 2001a; McDermott *et al.*, 2006). Les mutations tronquantes sont également réparties tout le long de la séquence codante de *SPG4* et sont supposées générer des protéines tronquées stables ou instables dont la taille est inférieure à 40 acides aminés pour la plus petite et de 606 acides aminés pour la plus grande (Patrono *et al.*, 2005; Shoukier *et al.*, 2009 ; Figure 22). Bien que des mutations tronquantes aient été identifiées au niveau de chaque exon, 23% d'entre elles sont concentrées au niveau des exons 5 et 6 et conduisent à la déplétion de la totalité de la cassette AAA. Néanmoins, la mutation non-sens (p.W607X), identifiée dans l'exon 17, conduit à l'apparition d'un codon stop prématuré, qui coupe la protéine en aval de cette cassette (Patrono *et al.*, 2005). De même, dans cette région, deux mutations pathogéniques de type faux-sens (p.W607C et p.T615I) ont été également mises en évidence (Sauter *et al.*, 2002; Crippa *et al.*, 2006). Ces données soulignent que la cassette ATPase n'est pas la seule région de la partie C-terminale de la spastin à être cruciale pour sa fonction.

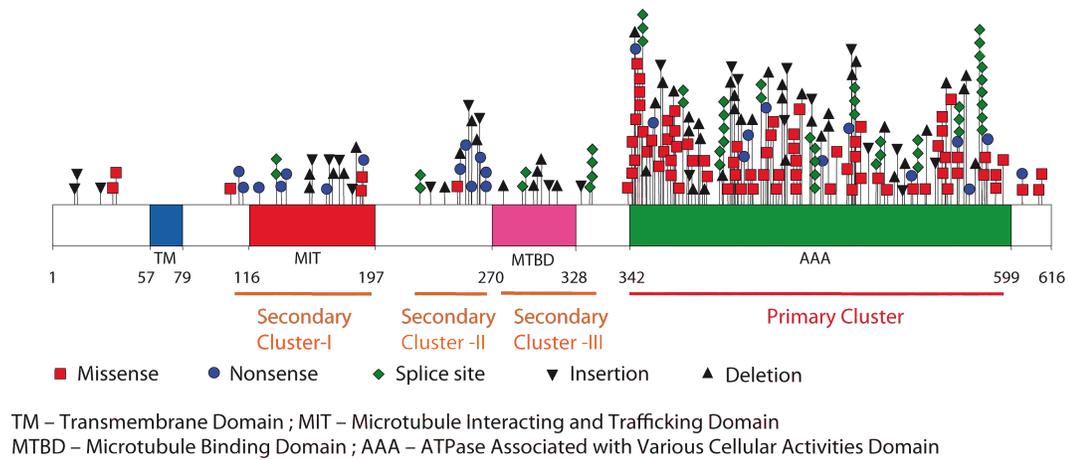


FIGURE 22 – Distribution des mutations ponctuelles au sein de la séquence primaire de la spastin (plus de 200 mutations, mises à jour en 2009). Les mutations faux-sens (carrés rouges), non-sens (ronds bleus), d'épissage (losanges verts), les insertions ainsi que les délétions (triangles noirs) sont localisées sur la séquence protéique de la spastin. La zone la plus fréquemment mutée, qui correspond à la cassette AAA porteur de l'activité enzymatique de la spastin, est soulignée par un trait rouge : la quasi-totalité des mutations faux-sens y sont situées. Les autres 'points chauds' de mutations sont notés par des barres orange. Les mutations tronquantes sont réparties sur l'ensemble de la séquence. Adapté de Shoukier *et al.* 2009.

II.B.2 Les CNVs ou variations du nombre de copies

En 2007, l'émergence de la technique de MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) permettant le criblage de remaniements géniques de type duplication ou délétion, a permis d'identifier un grand nombre de microdélétions exoniques ou de plus larges délétions du gène *SPG4* ; la taille de ces délétions oscille entre celle d'un exon et celle de l'entièreté de la séquence codante du gène (Sauter *et al.*, 2002; Iwanaga *et al.*, 2005; Beetz *et al.*, 2006; Depienne *et al.*, 2007c; Erichsen *et al.*, 2007). Une duplication partielle de 19 nucléotides, localisée dans l'exon 1 (Proukakis *et al.*, 2003) ainsi que des duplications multi-exoniques pouvant s'étendre sur la quasi-totalité de la séquence codante du gène *SPG4* (ex2-17; Boone *et al.*, 2014) et conduisant à l'apparition d'un codon STOP prématuré ont été également découvertes (Mitne-Neto *et al.*, 2007; Boone *et al.*, 2014). Cependant, ces événements de duplication apparaissent bien moins fréquents que les délétions. A ce jour, plus de 50 CNVs (Copy Number Variations ou Variants) ont été décrits dans le gène *SPG4*, révélant le caractère fréquent de ces mutations (Boone *et al.*, 2011; Racis *et al.*, 2014). L'identification de

ces CNVs a considérablement modifié le spectre et la fréquence des différents types de mutations dans *SPG4*. Les CNVs affectant le gène *SPG4* sont à ce jour aussi fréquents (environ 20%) que les mutations ponctuelles (Beetz *et al.*, 2006; Depienne *et al.*, 2007c; Shoukier *et al.*, 2009). L'apparition de ces CNVs au sein du gène *SPG4* semble majoritairement due à des réarrangements génomiques impliquant les séquences répétées Alu, comme en témoigne l'analyse nucléotidique des points de cassures flanquant ces CNVs (Boone *et al.*, 2011, 2014). De fait, l'architecture du gène *SPG4* riche en éléments répétés rendrait ce locus particulièrement susceptible à des réarrangements génomiques.

Certains CNVs semblent s'étendre au-delà du gène *SPG4* et affecter les gènes situés dans son voisinage. Par exemple, certaines délétions situées dans la partie 3' du gène entraînent la formation d'un transcrite chimérique composé de *SPG4* et du gène voisin *SLC30A6*, codant un transporteur du zinc et dont l'expression est altérée chez des patients présentant un déficit cognitif, dont certains atteints de la maladie d'Alzheimer (Figure 23 ; Lovell *et al.*, 2006; Boone *et al.*, 2014). En outre, certaines délétions du gène *SPG4* s'étendent en 5' jusqu'à la région promotrice et les premiers exons du gène *DPY30* et affectent son expression (Figure 23 ; Racis *et al.*, 2014). Il est intéressant de noter que le gène *DPY30* joue un rôle important dans le trafic endo-lysosomal à l'image de la spastin (Newton, 2016), ce qui pourrait suggérer une relation épistatique entre ces deux gènes et expliquer la précocité marquée des symptômes dans le cas de larges délétions incluant ces deux gènes. Ainsi, les gènes avoisinant le locus *SPG4* pourraient être considérés comme des modificateurs du phénotype observé pour des formes de PSH liées à des délétions de *SPG4*.

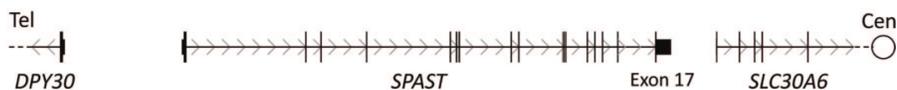


FIGURE 23 – **Représentation schématique du voisinage génomique du gène *SPG4* (aussi appelé *SPAST*)**. Le schéma est orienté avec le télomère (Tel) du chromosome 2 à gauche et le centromère (Cen) à droite. Le sens 5'>3' de chaque gène est représenté par des chevrons. En 5' du gène *SPG4*, se trouve le gène *DPY30* dont l'orientation est inversée, ce qui pourrait suggérer l'existence de séquences régulatrices communes à ces deux gènes et expliquer les variations de l'expression de *DPY30* associées à certains CNVs du gène *SPG4* (Racis *et al.*, 2014). A proximité de l'extrémité 3' du gène *SPG4* se trouve le gène *SLC30A6*. Certains CNVs incluant l'exon 17 de *SPG4* entraînent la formation de transcrits chimériques *SPG4/SLC30A6* (Boone *et al.*, 2014). Extrait de Boone *et al.* 2011.

II.B.3 Polymorphismes et modificateurs intragéniques

Seule une dizaine de polymorphismes ont été décrits au sein du gène *SPG4* incluant, outre ses régions codantes, certaines parties non codantes comme les régions promotrices, 3'UTR, et certains introns (Fonknechten *et al.*, 2000; Sauter *et al.*, 2002), ce qui souligne le haut degré de conservation de cette protéine au cours de l'évolution et sa faible tolérance face aux substitutions d'acides aminés. Deux polymorphismes localisés au niveau de l'exon 1 ont cependant fait l'objet d'une attention toute particulière : il s'agit de **S44L** et **P45Q** (Svenson *et al.*, 2004). En effet, ces deux variants ont été à plusieurs reprises considérés comme des modificateurs intragéniques du phénotype qui, lorsqu'ils sont associés à une mutation pathogénique de *SPG4*, sont à l'origine d'un phénotype nettement plus précoce et plus sévère (Fonknechten *et al.*, 2000; Lindsey *et al.*, 2000; Svenson *et al.*, 2004; McDermott *et al.*, 2006; Depienne *et al.*, 2007a). Plusieurs hypothèses pourraient expliquer le caractère aggravant de ces polymorphismes. (i) Le polymorphisme S44L conduit à la substitution d'une Sérine susceptible d'être phosphorylée par une kinase de type Cdk (cycline dependant kinase) par un résidu Leucine. La phosphorylation est une modification post-traductionnelle essentielle à la régulation de l'activité d'un grand nombre de protéines, et notamment de protéines régulant la dynamique du cytosquelette. Cependant, la kinase impliquée dans la phosphorylation de ce résidu Sérine en position 44, ainsi que les éventuelles conséquences de cette modification sur l'activité de la spastin sont à ce jour méconnues. (ii) De plus, ces deux polymorphismes altèrent la séquence d'un motif PEST de dégradation protéique qui s'étend de l'acide aminé 23 à 45 et qui jouerait un rôle clé dans la régulation du turnover de cette protéine. En effet, il a été montré que ces deux polymorphismes affectent la dégradation de la spastin *in vitro* (Schickel *et al.*, 2007). Or, des altérations de ce motif pourraient stabiliser anormalement la protéine mutante si ces deux variants sont localisés en *cis*. De plus, ce domaine étant localisé dans une région spécifique à l'isoforme longue de la spastin, des modifications de ce motif pourraient aussi stabiliser anormalement l'isoforme longue de la spastin, perturber le ratio des isoformes majeures de spastin et créer une compétition pour certains substrats, partenaires d'interaction ou d'oligomérisation. (iii) Enfin, ces deux polymorphismes se situent également au

niveau du promoteur cryptique identifié dans l'exon 1 du gène *SPG4*. Or, l'un de ces polymorphismes affecte significativement l'activité de ce promoteur et réduit l'expression de l'isoforme courte. Ainsi, ces deux polymorphismes pourraient également aggraver le phénotype associé à une mutation de *SPG4* en perturbant le ratio entre les différentes isoformes de spastin (Mancuso and Rugarli, 2008).

II.B.4 Corrélation génotype/phénotype

En règle générale, il n'existe aucune corrélation génotype-phénotype entre le type de mutation ponctuelle dans *SPG4* et l'âge d'apparition des symptômes ou la sévérité de la maladie (Yip *et al.*, 2003; McDermott *et al.*, 2006; Shoukier *et al.*, 2009). Seule une étude décrit l'existence d'une telle corrélation dans une cohorte de patients bulgares atteints de PSH-AD liées au gène *SPG4* (Ivanova *et al.*, 2006). Dans cette analyse, les sujets porteurs de mutations faux-sens présenteraient des signes cliniques dès l'enfance et donc plus précocement que l'ensemble des patients porteurs de mutations non-sens ou de sites d'épissage, dont les premiers symptômes se déclarent à l'âge adulte. Toutefois, ces données sont à prendre avec précaution car le nombre de patients inclus dans cette étude est très limité, comparé aux méta-analyses réalisées précédemment (Yip *et al.*, 2003; McDermott *et al.*, 2006; Shoukier *et al.*, 2009). En revanche, bien que la symptomatologie des patients arborant des mutations ponctuelles ou des délétions exoniques dans le gène *SPG4* soit très comparable, l'âge d'apparition des symptômes est significativement plus précoce chez les patients porteur de délétions exoniques (Depienne *et al.*, 2007c).

En outre, aucune corrélation entre le phénotype clinique et le positionnement des mutations ponctuelles le long de la séquence codante du gène *SPG4* n'a été rapportée (Crippa *et al.*, 2006). En effet, chez les patients porteurs de mutations tronquantes, l'expressivité clinique de la maladie ne semble pas être dépendante de la taille prédictive de la protéine tronquée. Cette constatation est très bien illustrée par la similitude des phénotypes entre un patient porteur de la mutation tronquante p.E125X dans l'exon 1, qui déplete 80% de la protéine, et un sujet porteur de la mutation tronquante

dans l'exon 17 (p.W607X) qui conduit à la seule perte des 9 derniers acides aminés de la spastin (Patrono *et al.*, 2005). De plus, la combinaison de deux variants en *cis* ou en *trans* au sein de la séquence codante du gène *SPG4* semble être associée à un phénotype plus sévère et/ou plus précoce des patients (Svenson *et al.*, 2004; Depienne *et al.*, 2006; McDermott *et al.*, 2006).

En conclusion, l'absence de corrélation génotype-phénotype suggère que l'expressivité de la maladie chez les patients porteurs d'une mutation de *SPG4* est dépendante de gènes modificateurs du phénotype et/ou de facteurs épigénétiques et environnementaux.

II.B.5 Mécanismes Pathogéniques

L'haploinsuffisance semble être le mécanisme pathogénique associé à la vaste majorité des mutations du gène *SPG4*. Cependant certaines mutations faux-sens pourraient avoir un effet dominant négatif. L'analyse des ARNm extraits de biopsies de muscles ou de lignées lymphoblastoïdes de patients a montré une diminution drastique de la quantité de transcrits *SPG4* chez les patients porteurs de mutations tronquantes (Bürger *et al.*, 2000; Fonknechten *et al.*, 2000; Svenson *et al.*, 2001a), suggérant que ces mutations puissent affecter la stabilité du transcrit ou le rendre plus sensible à la dégradation par le processus de RNA-mediated decay (Bürger *et al.*, 2000; Svenson *et al.*, 2001a). En outre, différentes équipes ont montré qu'aucune protéine tronquée n'est décelable chez les patients ou les souris porteurs de mutations tronquantes dans *SPG4*. Seule une diminution du dosage de la spastin sauvage a pu être observée chez ces patients et modèles animaux (Figure 24; Charvin *et al.*, 2003; Kasher *et al.*, 2009; Riano *et al.*, 2009; Fassier *et al.*, 2013). Par ailleurs, l'identification récente de délétions exoniques conduisant à l'apparition d'un codon STOP prématuré et de larges délétions déplaçant parfois la totalité de la séquence codante de *SPG4* confirme que l'haploinsuffisance est le mécanisme pathogénique à l'origine de la vaste majorité de ces formes de PSH (Beetz *et al.*, 2006; Depienne *et al.*, 2007c,a; Erichsen *et al.*, 2007). En outre, l'absence de corrélation entre l'expressivité clinique de la maladie et la taille prédictive des protéines tronquées ou son absence chez les patients présentant une délétion complète de *SPG4* renforce cette hypothèse. Il existerait donc un seuil critique dans le niveau d'expression de la spastin en dessous duquel le maintien de l'intégrité des axones

ne pourrait plus être assuré pour un ensemble spécifique de neurones. Ce seuil de tolérance des neurones cortico-spinaux vis-à-vis d'une diminution de la quantité de spastin serait très faible, puisque certaines mutations dites « fuyantes » affectant des sites d'épissage et générant simultanément des transcrits normaux et des transcrits incorrectement épissés et instables, sont responsables de PSH bien qu'elles n'induisent qu'une diminution très modérée de la quantité d'ARNm sauvage (Svenson *et al.*, 2001a,b).

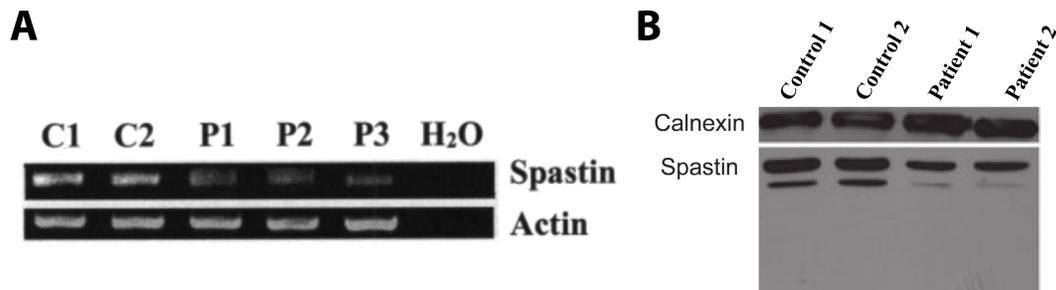


FIGURE 24 – **Analyse du niveau d'expression de la spastin chez des patients *SPG4*.** (A) RT-PCR du transcrite de la spastin, effectuée sur deux individus sains et trois porteurs de mutations dans *SPG4*. Comparé aux contrôles (C1, C2), le niveau d'expression du transcrite *SPG4* est réduit chez les patients porteurs de mutation non-sens (P1, P2) et d'une mutation décalant le cadre de lecture (P3), dévoilant l'instabilité des transcrits codant la spastin tronquée. (B) Western Blot révélant la spastin sur des échantillons provenant de deux contrôles et deux porteurs d'une mutation tronquante dans *SPG4* (p.S545X). On note une nette diminution du niveau de spastin chez les patients comparés aux contrôles mais pas la présence de la protéine tronquée. Le contrôle 2 et le patient 2 sont porteurs d'un polymorphisme (S44L), qui ne semble pas affecter le niveau d'expression protéique de la spastin. Modifié depuis Charvin *et al.* 2003; Riano *et al.* 2009.

Les mutations faux-sens affectant fréquemment des acides aminés hautement conservés au cours de l'évolution et localisés dans des domaines fonctionnels de la protéine, il est très probable qu'elles conduisent également à la perte de fonction de la spastin. Cependant, des études fonctionnelles menées *in vitro* comme *in vivo* suggèrent que certaines mutations faux-sens pourraient avoir un effet dominant négatif. En effet, certaines formes pathologiques de la spastin dépourvues d'activité ATPase restent liées de manière constitutive et anormale avec les microtubules (Errico *et al.*, 2002; McDermott *et al.*, 2003). Ces formes « mutées » de la spastin pourraient interférer avec la dynamique et/ou la fonction de ces polymères ou encore avec celle d'autres MAPs (Microtubule Associated Proteins). Dans ce sens, la liaison constitutive de la spastin altérée par les mutations

p.K388R ou p.R424G avec les microtubules perturbe le transport axonal antérograde dans des neurones corticaux de rats (McDermott *et al.*, 2003) ou l'organisation des tubules du RE dans des cellules non neuronales (Lumb *et al.*, 2012). Une étude *in vivo* chez la drosophile montre que les animaux transgéniques surexprimant une forme pathogénique de la spastin dépourvue d'activité ATPase (mutation équivalente p.K388R) dans un contexte sauvage présentent un phénotype similaire à celui des animaux totalement dépourvus de spastin, ce qui suggère un effet dominant négatif de cette protéine mutée sur la protéine sauvage (Orso *et al.*, 2005). Ce mécanisme pathogénique, qui n'a cependant pas été confirmé chez les mammifères, pourrait s'expliquer par le fait que la spastin exerce sa fonction sous forme d'hexamères (White *et al.*, 2007). Toutefois, cette hypothèse s'oppose indirectement aux études cliniques et génétiques qui ne relèvent aucune corrélation phénotype/génotype quelle que soit la mutation dans *SPG4*.

Enfin, le groupe de Peter Baas a suggéré que certaines mutations faux-sens ou tronquantes du gène *SPG4* pourraient avoir un effet 'gain de fonction toxique'. Cette hypothèse est fondée sur l'effet délétère de la surexpression de certaines protéines mutantes sur le transport axonal antérograde dans des axones géants de calamar, la dynamique des microtubules dans des cultures de fibroblastes, la morphologie des neurones corticaux en culture ou encore le phénotype locomoteur de mouches transgéniques exprimant ces protéines (Solowska *et al.*, 2008, 2010, 2014). Cependant, ces résultats restent très critiquables. En effet, il est important de mentionner que les protéines tronquantes qu'ils surexpriment n'ont jamais été détectées dans les tissus de patients ou de souris transgéniques arborant une mutation tronquante de *SPG4*. De plus, ces protéines mutantes sont surexprimées à des niveaux non physiologiques et leur effet n'est jamais comparé à la surexpression de la protéine sauvage.

III La protéine codée par *SPG4*

Le gène *SPG4* code la spastin, une protéine de 616 acides aminés dont le poids moléculaire prédictif est de d'environ 68 kDa (Hazan *et al.*, 1999).

III.A Ses différents domaines structuraux

La spastin appartient à la superfamille des ATPase de type AAA (ATPases Associated with diverse cellular Activities) caractérisée par un domaine ATPase de 200 à 250 acides aminés (a.a.) hautement conservé entre les différentes protéines de cette famille (Figure 25 ; Hazan *et al.*, 1999). Ce domaine ATPase est localisé dans sa région C-terminale et s'étend des a.a. 342 à 599. Au sein de ce domaine, on retrouve les différents motifs structuraux essentiels à l'activité de cette classe d'ATPase : (i) le motif walker A, impliqué dans la liaison de l'ATP, (ii) le motif Walker B, nécessaire à l'hydrolyse de l'ATP, le motif SRH (Second Region of Homology) qui contient des éléments requis dans la régulation de l'hydrolyse de l'ATP et l'oligomérisation de la protéine, (iii) un motif nommé 'senseur 2', qui possède un résidu Arginine en interaction directe avec le phosphate γ de l'ATP et qui semble être crucial pour la liaison et l'hydrolyse de l'ATP et enfin (iv) le motif « pore loop ou Ploop » dont les résidus sont situés à la surface du pore, au cœur des hexamères de spastin, et impliqués directement dans l'activité de cette protéine en permettant son interaction avec son substrat ainsi que le « traitement » de ce dernier (Hanson and Whiteheart, 2005).

Dans sa partie N-terminale la spastin contient d'autres domaines structuraux essentiels à sa fonction :

- le domaine MTBD (MicroTubule Binding Domain), s'étendant des a.a. 270 à 328, est nécessaire et suffisant à la liaison de la spastin avec les microtubules et ce, indépendamment de l'ATP. Ce domaine est essentiel à l'activité de cassure des microtubules de la spastin dont nous reparlerons plus en détail par la suite (Figure 25 ; White *et al.*, 2007) ;
- le domaine MIT (Microtubule Interacting and Trafficking protein) qui s'étend des a.a. 116 à 194, permet à la spastin d'interagir avec certains membres du complexe ESCRT-III (Endosomal Sorting Complex Required for Transport) impliqué dans la scission des membranes endosomales (Figure 25 ; Reid *et al.*, 2005 ; Renvoisé *et al.*, 2010 ; Lumb *et al.*, 2012). De façon intéressante, ce domaine est retrouvé chez d'autres protéines telles que SNX15, Vps4 et SKD1, toutes impliquées dans la morphogénèse des endosomes et le trafic membranaire par les endosomes précoces et tardifs (Ciccarelli *et al.*, 2003) ;

- le domaine transmembranaire (HD pour Hairpin Domain) localisé sur les a.a. 57-79, très hydrophobe et formant une structure en épingle à cheveux, permet l'insertion de la spastin dans la membrane du RE via son interaction avec d'autres protéines de PSH telles que l'atlastin-1 ou REEP1 (Figure 25 ; Park *et al.*, 2010) ;
- deux séquences de localisation nucléaire (ou NLS) en positions 4-10 et 309-312 (Figure 25 ; Beetz *et al.*, 2004) permettent son import actif dans le noyau (Claudiani *et al.*, 2005) ;
- deux signaux d'export nucléaire (NES) chevauchants, en positions 59-67 et 64-73 permettent l'export actif de la spastin dans le cytoplasme (Figure 25 ; Claudiani *et al.*, 2005) ;
- deux motifs de liaison à l'ADN de type leucine-zipper (LZ) localisés au niveau des a.a. 50-78 et 508-529 ainsi qu'un domaine de dimérisation Hélice-boucle-Hélice (HbH) en position 478-486 sont potentiellement nécessaires à une fonction nucléaire de la spastin (Figure 25 ; Hazan *et al.*, 1999).

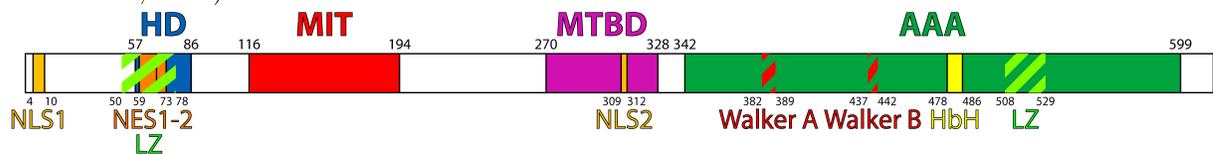


FIGURE 25 – Représentation schématique de la structure primaire de la spastin et de ces différents motifs et domaines structuraux. HD : Hairpin Domain, MIT : Microtubule-Interacting and Trafficking ; MTBD, Microtubule-Binding Domain, AAA : domaine ATPase des protéines de type 'ATPases Associated with Diverse Cellular Activities', NLS : Nuclear Localisation Signal, NES : Nuclear Export Signal, HbH : motif Hélice-boucle-Hélice, LZ : Leucine Zipper.

III.B Structure quaternaire de la spastin

Comme de nombreuses protéines de la famille AAA, la spastin est capable de s'oligomériser en présence d'ATP pour former un hexamère (oligomère présentant six unités ou protomères). L'hexamérisation de la spastin conduit à la formation d'une cavité centrale dont la majorité de la surface est constituée de boucles formées par les motifs Ploop 1 et Ploop 2 contenus dans la cassette AAA et qui sont essentiels à son activité de cassure des microtubules (White *et al.*, 2007). En effet, des mutations faux-sens affectant certains résidus conservés de ces motifs ont été identifiées chez des patients. La cristallographie du domaine AAA de la spastin de drosophile et d'une construction

artificielle ne comprenant que les domaines MIT et AAA de la spastin de *C.elegans* a permis de caractériser la structure tridimensionnelle de cette cassette ATPase et de révéler les bases de l'activité enzymatique de la spastin (Roll-Mecak and Vale, 2008). Une étude cristallographique ultérieure sur la spastin humaine a confirmé les conclusions obtenues sur ses orthologues de drosophile et de *C. elegans* (Taylor *et al.*, 2012). La spastin s'hexamérise donc sous la forme d'un anneau de 50Å de diamètre, contenant six bras radiaux ancrés aux microtubules et formant un pore central de 20Å de diamètre dans laquelle la queue C-terminale (20 a.a.) de la tubulin s'engouffre grâce à des interactions de charge entre ses résidus Glutamates chargés négativement et certains acides aminés chargés positivement des boucles du pore (Figure 26 ; Roll-Mecak and Vale, 2008).

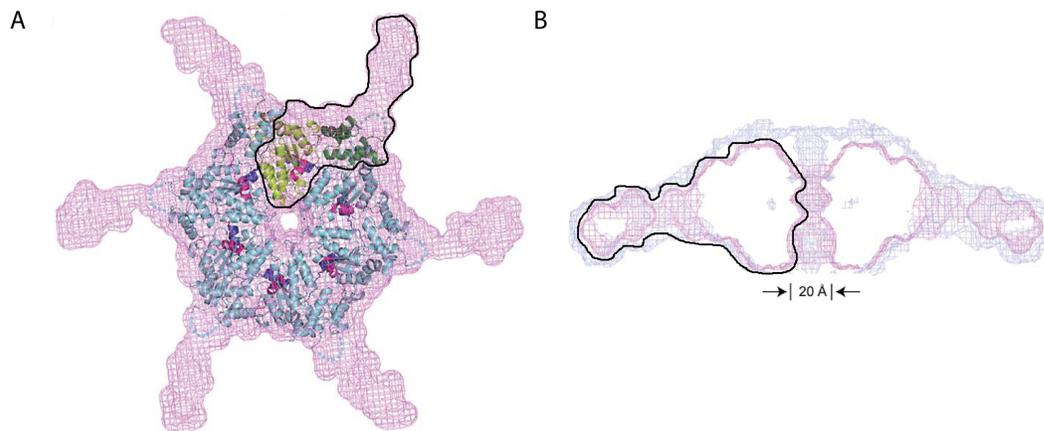


FIGURE 26 – **Représentations graphiques de la structure quaternaire de la spastin.** (A) La spastin est représentée sous forme d'hexamère, où un protomère est encadré en noir. Seule la structure tridimensionnelle de la cassette AAA a été analysée et apparaît ici en « ruban ». (B) Coupe transversale le long de l'axe passant par le pore central formé par les six protomères. Modifié depuis Roll-Mecak and Vale.

Différentes expériences utilisant des peptides compétitifs, des anticorps bloquants ou encore des drogues (comme la subtilisin) coupant spécifiquement la queue C-terminale de la tubulin ont permis de révéler l'importance de cette interaction pour l'activité de cassure des microtubules par la spastin. La force mécanique générée suite à l'hydrolyse de l'ATP déstabiliserait les interactions tubulin-tubulin au sein du polymère et conduirait à son désassemblage (White *et al.*, 2007; Roll-Mecak and Vale, 2008). L'étude de systèmes reconstitués *in vitro* a permis de préciser le processus d'hexamérisation de la spastin (Eckert *et al.*, 2012). Les monomères de spastin se lient de manière lâche aux

microtubules, via des interactions électrostatiques, qui lui permettent de diffuser le long du filament et de rencontrer d'autres protomères. Par la suite, la spastin se dimérise avant de s'hexamériser très rapidement sur son substrat. Cette dimérisation représente une étape critique à la formation de complexes actifs et l'ajout artificiel d'un domaine coiled-coil à l'extrémité N-terminale de la spastin rend cette enzyme constitutivement active (Eckert *et al.*, 2012). Enfin, l'hydrolyse de l'ATP va conduire à la dissociation de la spastin et de son substrat ou de ses partenaires d'interaction et au désassemblage de l'hexamère (White *et al.*, 2007).

III.C La spastin, une enzyme de cassure des microtubules appartenant au groupe méiotique des AAA

La spastin appartient à la superfamille des protéines AAA qui représente une large famille d'ATPases jouant des rôles pivots au sein de la cellule dans la transformation de l'énergie chimique en activités biologiques. Ces protéines sont présentes dans des compartiments cellulaires très variés où elles participent à de multiples processus cellulaires essentiels à l'homéostasie de la cellule comme le trafic vésiculaire, la biogénèse des organites, le remodelage du cytosquelette, la régulation du cycle cellulaire, la protéolyse, l'expression génétique, etc. (Figure 27; Patel and Latterich, 1998; Ogura and Wilkinson, 2001; Frickey and Lupas, 2004).

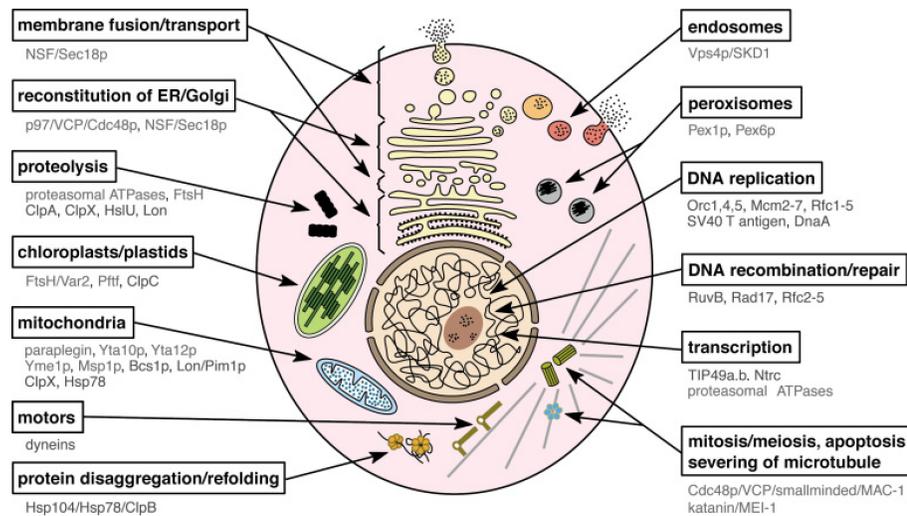


FIGURE 27 – **Diversité fonctionnelle des protéines de la superfamille des AAA.** Représentation schématique d'une cellule eucaryote avec ses différents organites et complexes macromoléculaires. Les localisation subcellulaire et fonction de différentes protéines AAA eucaryotes et procaryotes sont indiquées. D'après Ogura and Wilkinson 2001.

Néanmoins, cette diversité fonctionnelle est sous-tendue par un mécanisme moléculaire commun. En effet, l'ensemble de ces protéines utilise l'énergie issue de l'hydrolyse de l'ATP pour participer à l'assemblage ou au désassemblage de complexes macromoléculaires et opérer des changements conformationnels de leur substrat qui conduira à sa dégradation, son désassemblage ou son repliement (Lupas and Martin, 2002). L'importance de ces protéines dans le maintien de l'homéostasie cellulaire est soulignée par l'augmentation constante du nombre de maladies humaines associées au dysfonctionnement ou à la perte de fonction de ces protéines (Hanson and Whiteheart, 2005) comme les PSH (spastin et paraplégin), mais également une forme de démence frontotemporale (p97/VPC), certaines maladies péroxysomiales telle la maladie de Zellweger's (Pex1 et Pex6), ou encore une forme de dystonie (Torsin A) (Hanson and Whiteheart, 2005).

III.C.1 La sous-famille méiotique

Sur la base de leur similarité de séquence et de structure, les protéines de la superfamille des AAA ont été subdivisées en différents sous-groupes. La spastin appartient à la sous-famille 7, nommée groupe méiotique, à laquelle appartiennent également d'autres enzymes de cassure des microtubules comme la p60-katanin et la fidgetin ainsi que leurs paralogues découverts plus récemment, p60-katanin-like 1, p60-katanin-like 2, fidgetin-like 1 et fidgetin-like 2 et également des protéines régulatrices du trafic endosomal comme vps4p/SKD1 (Figure 28 ; Frickey and Lupas, 2004; Yang *et al.*, 2005; Sonbuchner *et al.*, 2010). En plus de leur cassette ATPase, certains membres de cette sous-famille présentent une caractéristique commune au niveau de leur extrémité N-terminale : la présence du domaine MIT (pour Microtubule-Interacting and Trafficking domain). Ce motif, retrouvé chez un grand nombre de protéines interagissant avec le complexe ESCRT-III, suggère l'implication de ces ATPases « méiotiques » dans des processus cellulaires dépendant du couplage entre le remodelage membranaire et celui du réseau de microtubules, comme le trafic endosomal, la cytodierèse, etc. (Figure 28 ; Monroe and Hill, 2016). De façon intéressante, ce domaine MIT est également retrouvé chez une autre protéine de PSH, la spartin (*SPG20*) impliquée dans la régulation du trafic endosomal et l'homéostasie des gouttelettes lipidiques (Edwards *et al.*, 2009; Renvoisé *et al.*, 2010, 2012).

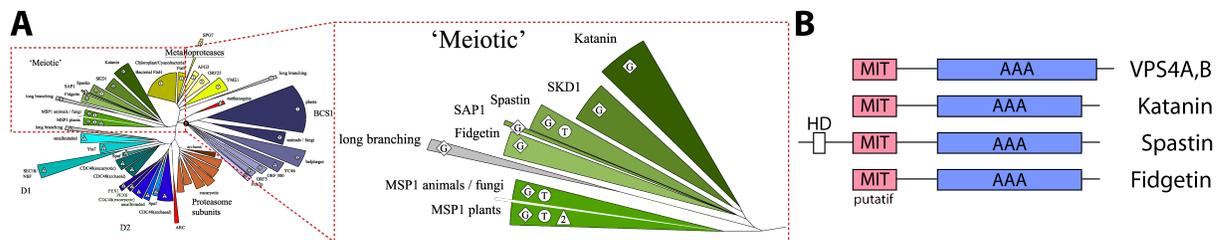


FIGURE 28 – **La sous-famille méiotique des AAA.** (A) Phylogénie des cassettes AAA. Représentation des différents sous-groupes de AAA (gauche) et détails du groupe « méiotique » des protéines AAA (encart). (B) Alignement des domaines structuraux de quatre membres de la sous-famille méiotique. Toutes les protéines appartenant à cette sous-famille possèdent un domaine MIT (rose), qui est retrouvé dans une grande variété de protéines interagissant avec le complexe ESCRT-III. Le domaine AAA (bleu) est, quant à lui, nécessaire à la cassure des microtubules par p60-katanin, spastin et fidgetin et au désassemblage du complexe ESCRT-III par Vps4. Modifié depuis Frickey and Lupas 2004, ainsi que Monroe and Hill 2016.

III.C.2 Rôle des différents membres de cette sous-famille

III.C.2.a Vps4, un membre à part Contrairement à la majorité des protéines constituant le sous-groupe méiotique, Vps4 est une ATPase qui n'a pas pour substrat les microtubules. En effet, cette protéine est requise dans la régulation du complexe ESCRT-III en utilisant l'énergie libérée par l'hydrolyse de l'ATP pour dissocier ce complexe macromoléculaire (Adell *et al.*, 2016). Cette fonction régulatrice de l'activité du complexe ESCRT-III va conférer à Vps4 un rôle clé dans les processus cellulaires dépendant de ce complexe, comme la cytodierèse (Elia *et al.*, 2011; Guizetti *et al.*, 2011), la maturation des endosomes tardifs en corps multivésiculaires (Teis *et al.*, 2008) ou la reformation de l'enveloppe nucléaire à la fin de l'anaphase (Vietri *et al.*, 2015). En effet, le complexe ESCRT-III participe activement à l'invagination et à la scission des membranes sous-tendant ces processus cellulaires et le dysfonctionnement de Vps4 inhibe la fission membranaire (Baumgärtel *et al.*, 2011; Elia *et al.*, 2011). De façon intéressante, le complexe ESCRT-III agit en étroite collaboration avec la spastin et permet son recrutement au niveau de compartiments cellulaires précis comme les endosomes, le midbody ou l'enveloppe nucléaire, où son activité de cassure des microtubules est indispensable à la fission des tubules endosomaux (Allison *et al.*, 2013), l'abscission du midbody (Connell *et al.*, 2009), ou encore le réassemblage de l'enveloppe nucléaire (Vietri *et al.*, 2015).

III.C.2.b Les enzymes de cassure des microtubules Les microtubules représentent l'un des constituants majeurs du cytosquelette de toutes les cellules eucaryotes et sont des régulateurs clés de la morphologie et de la mobilité cellulaire, du trafic intracellulaire, de la division cellulaire ou de la structure et de la mobilité des cils et des flagelles. Les microtubules sont des polymères polarisés hautement dynamiques constitués de dimères d' α - et β -tubulin avec une extrémité positive à croissance rapide et une extrémité négative à croissance lente. Les microtubules polymérisent et dépolymérisent de façon stochastique, un phénomène connu sous le nom d'instabilité dynamique (Mitchison and Kirschner, 1984; Kirschner and Schulze, 1986). L'organisation structurelle, la longueur ainsi que la dynamique des microtubules sont régulées de manière extrêmement fine par une myriade de protéines qui vont participer à leur assemblage (Tbca-Tbce), leur stabilisation (MAP2,

MAP1B, Tau), la régulation de la dynamique de leurs bouts « + » (EB1, EB3, CLIP-170) ou à leur désassemblage (Alfaro-Aco and Petry, 2015). Parmi les protéines participant au désassemblage de ces polymères, on distingue les enzymes dépolymérisantes comme la stathmine et SCG10, les moteurs moléculaires dépolymérisants comme MCAK et la kinesin 13 ou encore les enzymes de cassure des microtubules (MSE ; Microtubule-Severing Enzyme) comme spastin, p60-katanin et fidgetin qui utilisent l'énergie libérée par l'hydrolyse de l'ATP pour générer des cassures internes dans les polymères de microtubules (Hanson and Whiteheart, 2005; Yang *et al.*, 2005; Roll-Mecak and McNally, 2010; Sharp and Ross, 2012). De ce fait, ces MSE vont jouer un rôle important dans divers processus cellulaires dépendant des microtubules comme la mitose et la méiose, la biogénèse des cils et des flagelles ainsi que la neurogénèse (McNally and Vale, 1993; Sharp and Ross, 2012). Cependant, au fur et à mesure des années, leur fonction s'est révélée bien plus complexe et subtile que celle imaginée initialement, à savoir des enzymes qui catalysent la destruction rapide d'une partie du réseau de microtubule. En effet, les données fonctionnelles accumulées ces dernières années montrent que la cassure des microtubules est un processus qui permet également de (i) libérer les microtubules de leur point d'ancrage, un phénomène essentiel à leur transport ou leur dépolymérisation localisée, (ii) générer de nouveaux bouts « + » qui pourront servir de point d'ancrage pour la synthèse de nouveaux microtubules dynamiques, un processus déterminant pour accroître rapidement la masse de ces polymères ou encore (iii) engendrer de petits fragments de microtubules qui pourront être rapidement transportés dans les cellules, un processus connu sous le nom de « microtubule Cut and Run » (Baas *et al.*, 2005). Ce concept, fondé sur l'observation que le transport actif des microtubules est inversement proportionnel à leur taille, est tout particulièrement important pour le développement et la plasticité neuronale. En effet, dans les neurones, la cassure des longs microtubules immobiles en petit fragments très motiles va permettre d'approvisionner rapidement les points de branchements de l'axone et son extrémité, le cône de croissance, avec de grandes quantités de microtubules qui vont être indispensables à la croissance de l'axone et de ses branches collatérales (Baas *et al.*, 2005). En outre, si ces MSE ont été impliquées dans des processus cellulaires communs, elles semblent néanmoins y participer par le biais de mécanismes moléculaires distincts. Cette diversité couplée à l'évidente complémentarité fonctionnelle des MSE sont parfaitement illustrées par des travaux

qui décrivent le rôle de ces protéines dans la mitose, et plus précisément dans le mécanisme de « Pacman Flux » (Zhang *et al.*, 2007a). Ce mécanisme, indispensable à la séparation et traction des chromatides vers les pôles mitotiques au cours de l'anaphase, désigne la mise en place d'un flux de dépolymérisation des microtubules du fuseau nucléaire. Lors de ce processus, la spastin et la fidgetin initient la dépolymérisation à partir des bouts « - » en les libérant de leur ancrage au centrosome et en les exposant ainsi à la dépolymérisation par la kinesin 13. Inversement, la p60-katanin casse les microtubules au niveau de leurs bouts « + » pour les libérer de leur ancrage au kinétochore et les rendre accessible à cette kinesin dépolymérisante (Figure 29 ; Zhang *et al.*, 2007a).

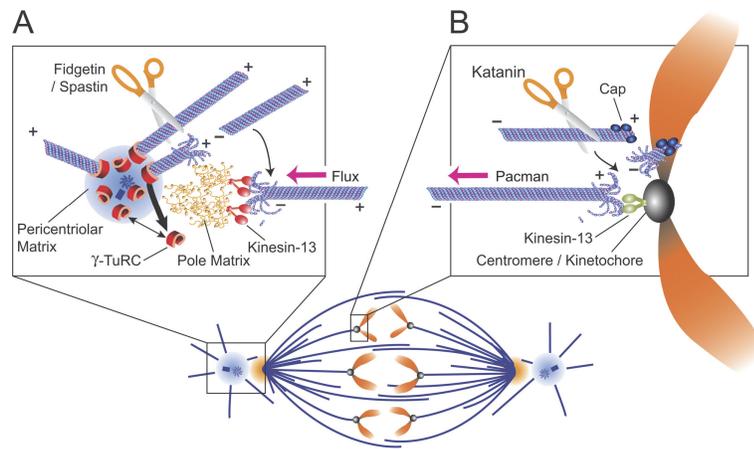


FIGURE 29 – **Modèle d'action de spastin, p60-katanin et fidgetin dans le mécanisme de “pacman-flux” lors de l'anaphase.** (A) La spastin et la fidgetin cassent les bouts « - » des microtubules et les libèrent de l'anneau protecteur de γ -tubulin (γ -TuRC) associé au centrosome du pôle du fuseau mitotique. Les nouvelles extrémités « - » ainsi générées vont être activement dépolymérisées par la kinesin 13. (B) La p60-katanin casse les microtubules à leur extrémité « + » et les libère ainsi de leur ancrage au kinétochore afin qu'ils soient également dépolymérisés par la kinesin 13. L'action combinée de ces MSE génère (A et B) un flux de dépolymérisation permettant le raccourcissement des microtubules du fuseau et la traction des chromatides vers les pôles mitotiques. D'après Zhang *et al.* 2007a.

Les fonctions exercées par ces MSE étant nombreuses et variées, pour l'objet de cette thèse, j'ai choisi de me focaliser sur la description de leurs fonctions dans des cellules neuronales.

III.C.2.b.i La p60-katanin et ses paralogues La p60-katanin, également connue sous le nom de « Samourai Cellulaire », est la première MSE à avoir été identifiée (Vale, 1991) et purifiée (McNally and Vale, 1993). Il s'agit d'un hétérodimère constitué de deux sous-unités de 60 et 80kDa nommées respectivement p60- et p80-katanin. Si la p60-katanin est la véritable enzyme de cassure des microtubules, la p80-katanin joue un rôle clé dans la régulation de la localisation et de l'activité de la sous-unité catalytique p60-katanin (Hartman *et al.*, 1998). La p60-katanin est fortement exprimée dans le système nerveux central et périphérique au cours du développement embryonnaire et tout particulièrement aux stades de développement correspondant à la phase de croissance axonale (Karabay *et al.*, 2004). Dans ce sens, sa perte de fonction ou la surexpression d'une forme dominante négative dans des neurones de mammifères en culture réduit la cassure des microtubules dans le soma, notamment au niveau du centrosome, et affecte de façon dramatique la croissance axonale (Ahmad *et al.*, 1999; Karabay *et al.*, 2004). De même, le *knockdown* de la p60-katanin a un effet particulièrement délétère sur la croissance axonale des neurones moteurs spinaux au cours du développement du poisson-zèbre (Butler *et al.*, 2010). En outre, des mutations nulles de la p60-katanin chez la drosophile affectent la croissance synaptique des neurones moteurs ainsi que la neurotransmission au niveau des jonctions neuromusculaires, et augmentent en contrepartie la complexité de l'arbre dendritique des neurones sensoriels périphériques (Mao *et al.*, 2014). Dans les neurones de mammifères, la p60-katanin joue également un rôle dans la formation des branches collatérales, un processus régulé négativement par la protéine Tau (Yu *et al.*, 2008b; Qiang *et al.*, 2010). Enfin, le rôle crucial de la p60-katanin dans le développement du système nerveux est soutenu par une étude récente rapportant l'identification de mutations dans le gène codant sa sous-unité régulatrice, la p80-katanin, dans des maladies associées à des malformations du cortex cérébral chez l'homme, et dont l'origine semble liée à une altération de la division asymétrique des progéniteurs neuraux (Mishra-Gorur *et al.*, 2014).

A l'image de sa paralogue, la p60-katanin-like 1 semble être également impliquée dans le développement du système nerveux. En effet, au cours du stade larvaire de la drosophile, la p60-katanin-like 1 régule la complexité de l'arbre dendritique de certains neurones sensoriels en stimulant la croissance des microtubules et en stabilisant les branches naissantes (Stewart *et al.*, 2012). A contrario, l'activité de cassure des microtubules de la p60-katanin-like 1 est nécessaire à l'élagage de l'arbre dendritique des neurones sensoriels lors de la métamorphose de la mouche (Stewart *et al.*, 2012).

III.C.2.b.ii La fidgetin et ses paralogues La fidgetin a été identifiée comme la protéine dont le dysfonctionnement est à l'origine des défauts développementaux du mutant murin spontané *Fidget*, qui présente une agénésie des canaux semi-circulaires de l'oreille interne, une microphthalmie ainsi que des malformations osseuses (Cox *et al.*, 2000). Cependant, son activité de cassure ne fut décrite qu'en 2007 en comparaison de celles de la spastin et de la p60-katanin, lors de l'étude sur les différents acteurs du « Pacman flux » au cours de l'anaphase (Zhang *et al.*, 2007a). Son rôle dans les neurones ne fut révélé que très récemment par des travaux de l'équipe de Peter Baas, qui ont montré que la perte de fonction de la fidgetin chez la drosophile affecte la croissance synaptique et la dynamique des microtubules au niveau des jonctions neuromusculaires de façon similaire à l'action de la spastin et de la p60-katanin (Leo *et al.*, 2015). De plus, la fidgetin est fortement exprimée dans le système nerveux embryonnaire des rongeurs et des perturbations de son expression affectent la morphologie des neurones en culture. En effet, sa surexpression inhibe la croissance axonale et le nombre de processus mineurs, définis comme les futures dendrites qui n'ont pas encore acquis leur identité dendritique (Leo *et al.*, 2015). A l'inverse, la perte de fonction de cette MSE augmente la longueur des axones et le nombre de processus mineurs, un phénotype que les auteurs associent à un accroissement de la masse de microtubules labiles dans l'axone. La fidgetin agirait donc comme un gardien de la dynamique des microtubules, chargé de restreindre la quantité de microtubules labiles (Leo *et al.*, 2015).

A ce jour, aucune donnée de la littérature ne traite de l'expression et du rôle de ses paralogues, fidgetin-like 1 et fidgetin-like 2 dans le système nerveux. Cependant, notre équipe a récemment conduit la première analyse fonctionnelle de la fidgetin-like 1 *in vivo* chez l'embryon de poisson-zèbre. Cette étude pionnière nous a permis de révéler que la fidgetin-like 1 est un acteur clé du développement des circuits moteurs chez l'embryon de poisson-zèbre de par sa capacité à interagir et à remodeler les microtubules au sein du cône de croissance. En effet, nous avons montré que la perte et le gain de fonction de cette ATPase altèrent considérablement et distinctement la croissance et la trajectoire axonales des motoneurons, et par voie de conséquence, la mobilité des larves. De plus, notre étude révèle que cette protéine régule la dynamique des microtubules dans le cône de croissance, non pas en cassant les microtubules comme le font ses homologues, spastin, fidgetin et p60-katanin mais en régulant la composition et la dynamique des bouts « + » de ces polymères via son interaction spécifique avec les fameuses protéines de liaison des bouts plus, EB1/EB3 (Fassier *et al.*, en révision).

Si l'ensemble des MSE présentées ci-dessus semblent jouer un rôle important au cours du développement du système nerveux, la spastin est la seule MSE enrichie dans le système nerveux adulte, dont les mutations sont responsables d'une maladie neurodégénérative progressive chez l'homme (Hazan *et al.*, 1999), ce qui laisse entrevoir un rôle spécifique pour cette ATPase dans le maintien de l'homéostasie axonale. Les diverses fonctions attribuées à la spastin seront décrites plus en détail dans les paragraphes suivants.

IV Les isoformes de spastin

Quatre isoformes distinctes de la spastin ont été décrites. Ces dernières sont issues d'une part de l'épissage alternatif de l'exon 4 et d'autre part de l'utilisation différentielle des deux sites d'initiation de la traduction, localisés au niveau de l'exon 1 du gène *SPG4* (Méthionine 1 et Méthionine 87 chez l'homme; Claudiani *et al.*, 2005) et très conservés au cours de l'évolution (Figure 30). En effet, la traduction alternative du transcrit pleine longueur va donner lieu à deux isoformes majoritaires : une isoforme longue communément appelée M1 (pour Méthionine 1) de 68kDa et une isoforme courte

appelée M87 (pour Methionine 87 chez l'homme, ou M85 chez la souris) de 60kDa. Sur le même principe, le transcrit épissé de l'exon 4 (Δex4) va donner lieu à deux isoformes de 64kDa (M1 Δex4) et 55kDa (M87 Δex4) traduites respectivement à partir du premier ou du deuxième ATG. Il est à noter que les isoformes issues de la traduction alternative possèdent des domaines structuraux différents. En effet, M87 est amputée des 86 premiers acides aminés de l'extrémité N-terminale de M1 et ne possède donc plus de domaine transmembranaire de type Hairpin ni de NES (Nuclear Export Signal) comparée à l'isoforme longue, suggérant une spécificité fonctionnelle pour M1 (Figure 30).

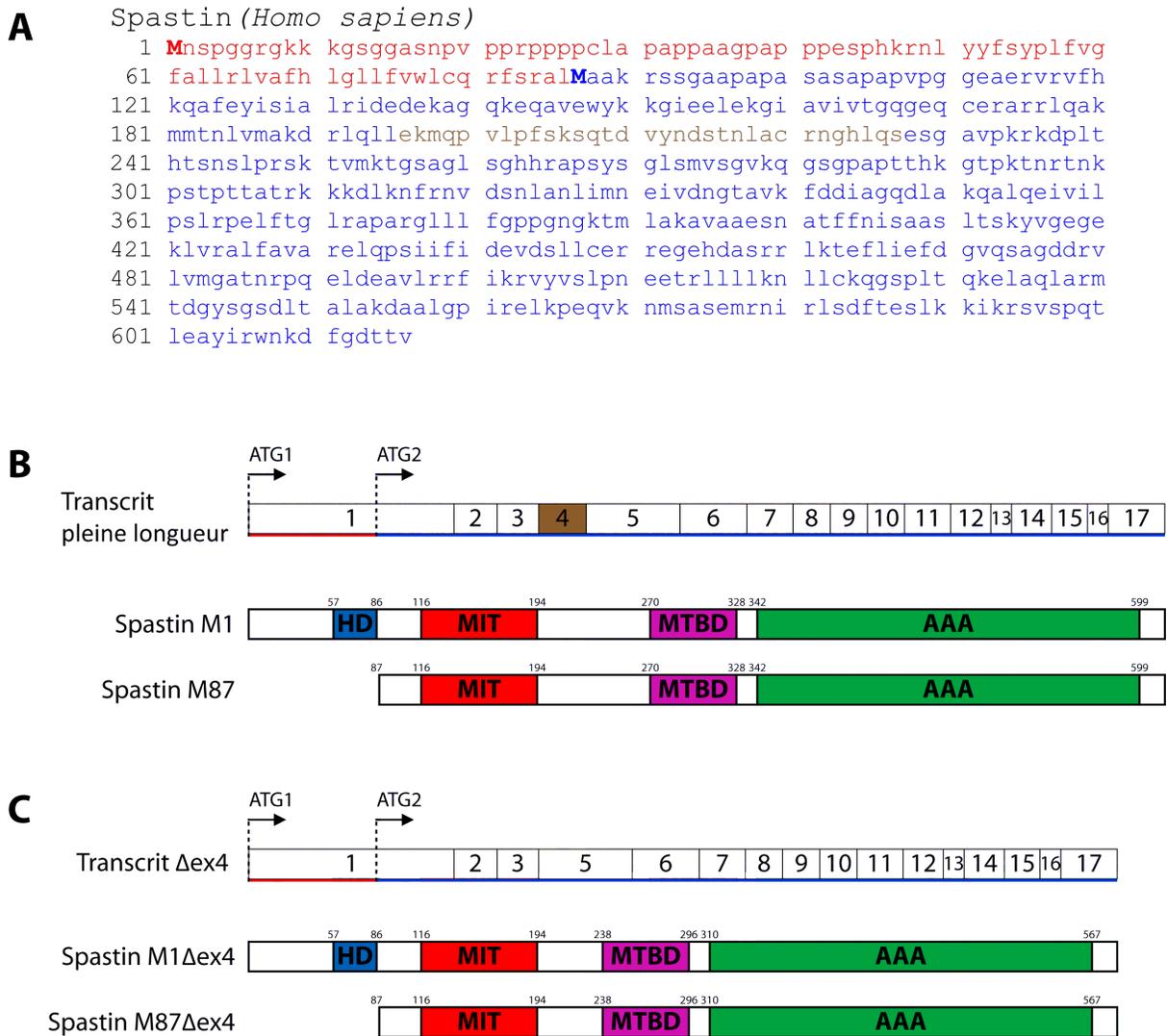


FIGURE 30 – Séquence peptidique de la spastin humaine (NP_055761) et représentation schématique de ses isoformes majoritaires. (A) La séquence spécifique à l'isoforme longue est notée en rouge, la séquence commune aux deux isoformes en bleu, la séquence peptidique correspondant à l'exon 4 en brun et les deux codons initiateurs (M pour Méthionine) apparaissent en lettres capitales et en gras. (B,C) Les quatre isoformes majoritaires de la spastin codées par des transcrits pleine longueur (B) et épissé de l'exon 4 (C), et représentées avec leurs domaines structuraux. Chaque transcrit permet la traduction de deux isoformes (M1 et M87) par initiation de la traduction à partir de l'ATG1 ou de l'ATG2. Les domaines principaux de la spastin sont ainsi représentés : HD, Hairpin Domain ; MIT, Microtubule-Interacting and Trafficking ; MTBD, Microtubule-Binding Domain ; AAA, ATPase domain. Séquence peptidique de la spastin humaine disponible sur le site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Numéro d'accèsion : NP_055761.

IV.A Patron d'expression de la spastin

La spastin (toutes isoformes confondues) est une protéine ubiquitaire majoritairement exprimée dans le système nerveux fœtal et adulte chez l'homme et la souris (Charvin *et al.*, 2003; Wharton *et al.*, 2003). Dans le système nerveux, l'expression de la spastin est étendue à l'ensemble du cerveau et de la moelle épinière et ne semble pas restreinte au système moteur. Dans le cerveau, la spastin est enrichie au niveau du cortex, et plus particulièrement dans les cellules pyramidales. Toutefois, elle semble également exprimée de manière assez prononcée dans le striatum, le cervelet (notamment au niveau des cellules de Purkinje), l'hippocampe, l'amygdale, la substance noire ainsi que dans les nerfs crâniens moteurs et ce, chez l'homme comme chez la souris (Charvin *et al.*, 2003; Wharton *et al.*, 2003; Ma *et al.*, 2006). Dans la moelle épinière, la spastin est enrichie dans les neurones de la matière grise, incluant les motoneurones spinaux, et de façon plus modérée dans les axones des colonnes ventrales, latérales et dorsales (Wharton *et al.*, 2003). Bien que l'expression de la spastin soit étendue à l'ensemble du système nerveux, cette ATPase ne semble pas exprimée dans les cellules gliales (Charvin *et al.*, 2003; Wharton *et al.*, 2003). Ce patron d'expression assez répandue dans l'ensemble du système nerveux ne permet donc pas d'expliquer la spécificité de l'atteinte neuronale dans la pathogénèse des PSH.

De façon intéressante, le ratio d'expression entre les isoformes longue M1 et courte M87 est déséquilibré en faveur de l'isoforme courte (M87). En effet, les isoformes M87 et M87 Δ ex4 sont majoritairement exprimées dans tous les tissus par rapport aux formes M1 et M1 Δ ex4. Cependant, ces deux formes longues sont fortement enrichies dans le système nerveux adulte comparé aux autres tissus et plus particulièrement dans la moelle épinière, où se situe la neurodégénérescence majeure des PSH. (Figure 31; Claudiani *et al.*, 2005).

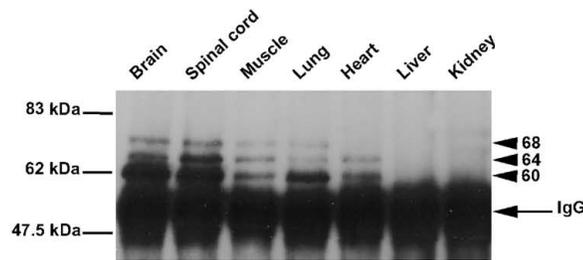


FIGURE 31 – **Enrichissement des isoformes M1 et M1 Δ ex4 dans le système nerveux.** Immunoprécipitation de la spastin à partir d'extraits protéiques de différents tissus murins. Les isoformes M1 et M1 Δ exon4 (de 68 et 64 kDa respectivement) sont plus abondantes dans le cerveau et la moelle épinière que dans les autres tissus, soulignant leur importance marquée dans les tissus atteints par les PSH. Extrait de Claudiani *et al.* 2005.

Cette expression différentielle entre les deux isoformes majoritaires de la spastin s'explique en grande partie par la présence d'une séquence de Kozak moins favorable à l'initiation de la traduction au voisinage du premier ATG que celle entourant l'ATG2 qui est en revanche proche de la séquence consensus (Claudiani *et al.*, 2005). De plus, il semblerait que l'utilisation préférentielle de l'un ou l'autre de ces deux ATG soit régulée par la région 5'UTR de *SPG4*, qui s'avère être hautement conservée au cours de l'évolution. En effet, lorsque l'ADNc de la spastin est cloné avec sa séquence 5'UTR et transfecté dans des cellules, l'expression de la forme courte prédomine. Inversement, s'il est cloné à partir du premier ATG, l'isoforme M1 est alors majoritairement exprimée (Claudiani *et al.*, 2005). De façon étonnante, bien qu'elle soit dégénérée en comparaison de la séquence consensus, la séquence de Kozak flanquant l'ATG1 est très bien conservée au cours de l'évolution, au même titre que l'ensemble de la séquence 5'UTR, suggérant l'importance d'une régulation fine du ratio de ces deux isoformes pour la fonctionnalité de la spastin (Figure 32).

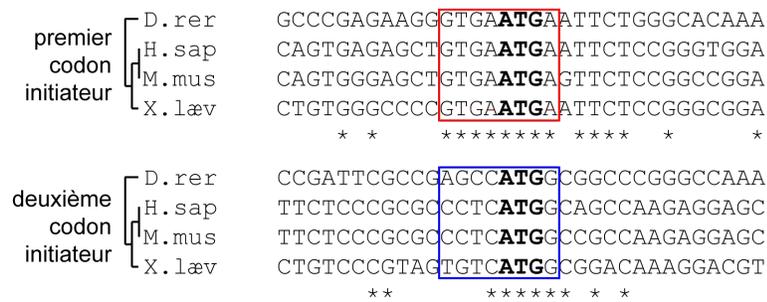


FIGURE 32 – **Alignement du contexte génétique des deux codons initiateurs de la traduction (ATG) de la spastin chez différentes espèces vertébrées.** (D.rer, poisson-zèbre ; H.sap, humain ; M.mus, souris ; et X.læv, xénope). La séquence Kozak entourant le premier codon ATG (cadre rouge) est conservée au cours de l'évolution (étoiles), tandis que celle du second ATG (cadre bleu) l'est beaucoup moins, précisant l'importance de la régulation de l'expression de l'isoforme longue.

Dans ce sens, d'autres mécanismes de régulation traductionnels et post-traductionnels semblent contribuer au déséquilibre du ratio M1/M87 au détriment de l'isoforme longue : (i) le promoteur cryptique, situé dans l'exon 1 du gène *SPG4* dirige la synthèse d'un transcrit plus court ne donnant naissance qu'aux isoformes courtes (Mancuso and Rugarli, 2008) ; (ii) une uORF (pour upstream Open ReadinFrame) située dans la région 5'UTR et présentant une séquence de Kozak plus favorable à la traduction que celle avoisinant l'ATG1 réduirait plus particulièrement la traduction à partir de l'ATG1 par un phénomène de compétition (Figure 33 ; Mancuso and Rugarli, 2008) ; (iii) un motif PEST, favorisant la dégradation protéique a été identifié dans la région N-terminale spécifique à l'isoforme longue (a.a. 23-45), suggérant un turn-over plus rapide pour cette isoforme (Schickel *et al.*, 2007).

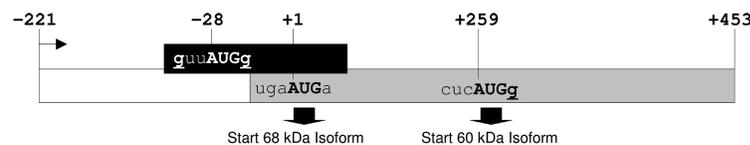


FIGURE 33 – **Schéma représentant le cadre ouvert de lecture en amont (uORF) de l'ORF *SPG4*.** La traduction de la spastin débute à partir des deux codons initiateurs (AUG) en phase (en positions +1 et +259). L'uORF (en noir) est également en phase et pourrait défavoriser l'initiation de la traduction à partir du premier codon (en gris). Extrait de Mancuso and Rugarli 2008.

IV.B Une localisation subcellulaire complexe

La spastin présente une localisation subcellulaire complexe et dynamique, qui varie en fonction du type cellulaire et du cycle cellulaire.

IV.B.1 Localisation subcellulaire de la spastin dans les cellules mitotiques

Au cours de la mitose, la spastin va décorer des structures où les microtubules sont hautement dynamiques. En effet, cette MSE va être successivement localisée au niveau du centrosome en début de métaphase, au niveau du fuseau et des pôles mitotiques à la fin de la métaphase et pendant l'anaphase, pour se situer au niveau du fuseau central de microtubules et du midbody à la fin de l'anaphase et au cours de la cytotélerèse (Errico *et al.*, 2004; Connell *et al.*, 2009; Goyal *et al.*, 2014). Une étude récente montre que la spastin est également recrutée autour de la chromatine au moment de l'anaphase (Vietri *et al.*, 2015).

Dans les cellules prolifératives en interphase, la spastin présente une localisation subcellulaire complexe et variée. Suivant le type cellulaire, la spastin peut être nucléaire, cytoplasmique ou encore nucléaire et cytoplasmique, un phénomène lié à la localisation différentielle de ces isoformes majoritaires. En effet, si les deux isoformes de la spastin possèdent un NLS commun (a.a. 309-312) leur permettant d'être activement transportés dans le noyau (Beetz *et al.*, 2004), seule la isoforme M1 possède deux NES dirigeant son export actif dans le cytoplasme par un mécanisme qui semble dépendre de l'exportin CRM1 (Claudiani *et al.*, 2005). Ainsi, alors que la forme courte apparaît nucléaire et cytoplasmique, la forme longue est exclusivement retrouvée dans le cytoplasme (Claudiani *et al.*, 2005). En outre, la spastin a été observée dans le cytoplasme au niveau de différents compartiments cellulaires, comme le centrosome (Svenson *et al.*, 2005; Goyal *et al.*, 2014), le RE (Park *et al.*, 2010; Lumb *et al.*, 2012; Montenegro *et al.*, 2012), les endosomes (Mannan *et al.*, 2006b; Connell *et al.*, 2009; Allison *et al.*, 2013) ainsi que les gouttelettes lipidiques (Papadopoulos *et al.*, 2015), suggérant une grande diversité fonctionnelle (Figure 34).

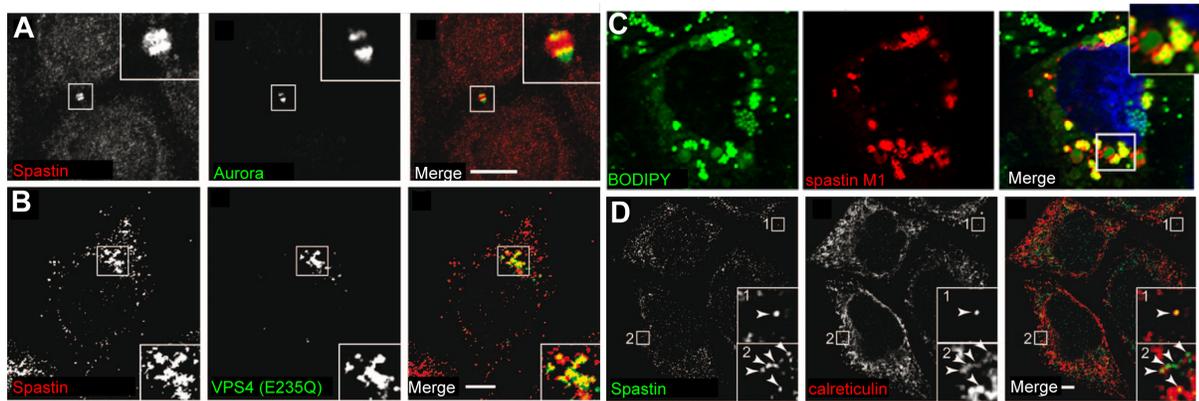


FIGURE 34 – Localisation des isoformes de la spastin dans des cellules HeLa. (A) Colocalisation de la spastin avec un marqueur du midbody, Aurora. (B) Colocalisation de la spastin avec une forme mutée de VPS4, utilisé ici comme un marqueur endosomal. (C) Colocalisation de l'isoforme longue (M1) de la spastin avec le marqueur BODIPY des gouttelettes lipidiques. (D) Colocalisation de la spastin avec la calreticulin qui marque les réseaux du RE. Modifié depuis Connell *et al.* 2009 et Papadopoulos *et al.* 2015.

De façon importante, seule l'isoforme M1 est capable de se localiser au RE et aux gouttelettes lipidiques (des organites dérivant du RE). En effet, le recrutement de la spastin au niveau de ces organites dépend de son domaine transmembranaire très hydrophobe en épingle à cheveux (HD), présent uniquement dans la région N-terminale spécifique de cette forme longue (Connell *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2010; Papadopoulos *et al.*, 2015). En revanche, M1 et M87 sont toutes deux recrutées au niveau des endosomes grâce à leur domaine MIT leur permettant d'interagir avec certains composants du complexe ESCRT-III (Reid *et al.*, 2005; Allison *et al.*, 2013). Une étude récente du groupe de Craig Blackstone suggère que seule l'isoforme M87 aurait la capacité de se localiser au centrosome par le biais de son interaction avec la protéine NA14 (Goyal *et al.*, 2014). Cependant, cette étude est en contradiction avec les travaux de Errico *et al.* (2004) qui montrent, par la technique du double hybride, que la région s'étendant des résidus 50 à 87, et donc spécifique à M1, est nécessaire pour cette interaction. Par ailleurs, il est important de mentionner que la plupart des études concernant la localisation subcellulaire de la spastin dans ces cellules non neuronales n'ont pas été réalisées avec des anticorps dirigés spécifiquement contre M1/M87 ou M1 uniquement et sont essentiellement fondées sur des expériences de surexpression de protéines tagguées, ce qui ne mime pas nécessairement ce qui se passe dans des conditions physiologiques.

IV.B.2 Localisation subcellulaire de la spastin dans les cellules neuronales

L'immunodétection de la spastin dans des cellules NSC-34 (lignée cellulaire immortalisée issue de la fusion de motoneurones spinaux avec des cellules de neuroblastome) à l'aide d'un anticorps polyclonal capable de reconnaître les différentes isoformes de spastin, révèle un enrichissement massif de cette protéine au niveau des points de branchements et du cône de croissance de ces neurones, deux structures caractérisées par d'importants remodelages dynamiques des microtubules (Figure 35 ; Errico *et al.*, 2004). Une distribution subcellulaire similaire de la spastin-EGFP fut par la suite décrite dans des cultures primaires de neurones hippocampiques de rat (Figure 35 ; Yu *et al.*, 2008b).

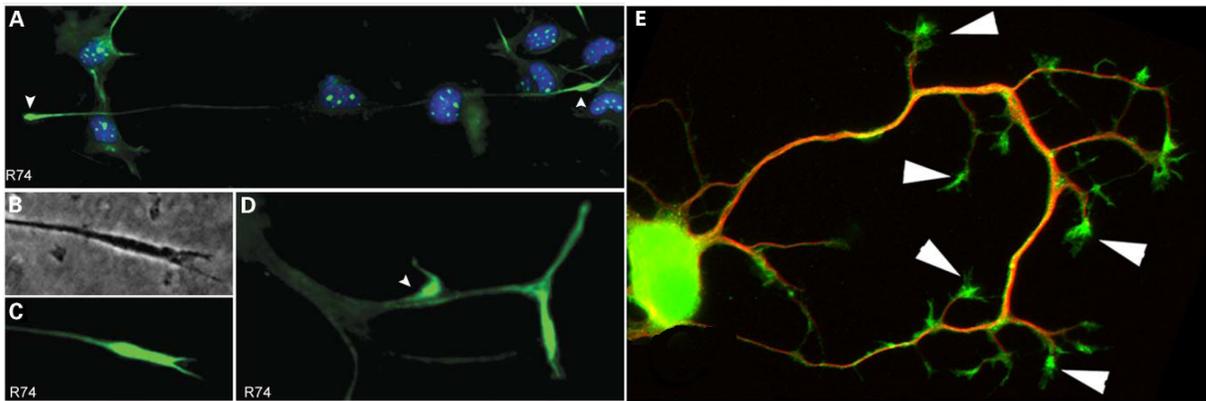


FIGURE 35 – **La spastin est fortement enrichie dans les points de branchement et les cônes de croissance des neurones en culture.** (A-D) Immunodétection de la spastin dans des cellules NSC-34 à l'aide d'un anticorps polyclonal reconnaissant ses différentes isoformes. La spastin est présente dans noyau et dans le cytoplasme où elle est enrichie dans les cônes de croissance (A, têtes de flèche) et dans les points de branchements (D, tête de flèches). (E) Surexpression de la spastin fusionnée à la GFP dans des neurones hippocampiques dont les microtubules apparaissent en rouge. On note un enrichissement de la spastin au niveau des extrémités axonales ainsi que sur leurs branches (tête de flèche). Extrait de Errico *et al.* 2004 et Yu *et al.* 2008b.

Cependant, une autre étude montre que dans ces mêmes cultures, la spastin endogène est localisée au niveau du centrosome et apparaît de façon ponctiforme tout au long de l'axone (Svenson *et al.*, 2005). De même, dans des cellules PC12 différenciées en cellules neuronales sous l'effet du NGF et surexprimant la spastin tagguée GFP ou Myc, ces protéines exogènes sont présentes sous forme de puncta dans le soma et tout au long des axones où elles colocalisent avec des marqueurs endosomaux et se retrouvent fortement enrichies à l'extrémité distale des axones (Reid *et al.*, 2005). Enfin, une

étude *in vivo* montre que la D-spastin (orthologue de la spastin chez la drosophile) est présente dans le soma et les axones et semble particulièrement enrichie au niveau des boutons présynaptiques des jonctions neuromusculaires, où elle est colocalisée avec la synaptotagmin, un marqueur des vésicules synaptiques (Trotta *et al.*, 2004). Étonnamment, aucune étude ne décrit la présence de spastin endogène au niveau du RE ou des gouttelettes lipidiques dans les neurones ni ne précise la localisation subcellulaire de M1 et M87 dans les cellules post-mitotiques. Toutefois, M1 et M87, porteuses d'une mutation pathogène affectant leur activité ATPase, présentent une localisation subcellulaire différente lorsqu'elles sont surexprimées dans des neurones corticaux. En effet, alors que M87 apparaît diffuse dans le cytoplasme et enrichie dans la région proximale de l'axone, M1 colocalise de façon anormale avec les microtubules dans le soma et tout au long de l'axone (Solowska *et al.*, 2014). En conclusion, cette distribution subcellulaire complexe de la spastin présage de l'importante diversité fonctionnelle de cette MSE.

IV.C Des partenaires particuliers

Comme l'ensemble des protéines AAA, la spastin doit sa spécificité fonctionnelle à sa région N-terminale qui englobe d'importants domaines structuraux comme le domaine Hairpin (HD) ou le domaine MIT (Figure 36). Ces domaines vont lui permettre d'être spécifiquement recrutée au niveau de différents sites d'action par le biais de son interaction avec plusieurs protéines adaptatrices, répertoriées dans le Tableau 5, et dont l'influence sur la fonctionnalité de la spastin sera précisée dans les paragraphes suivants.

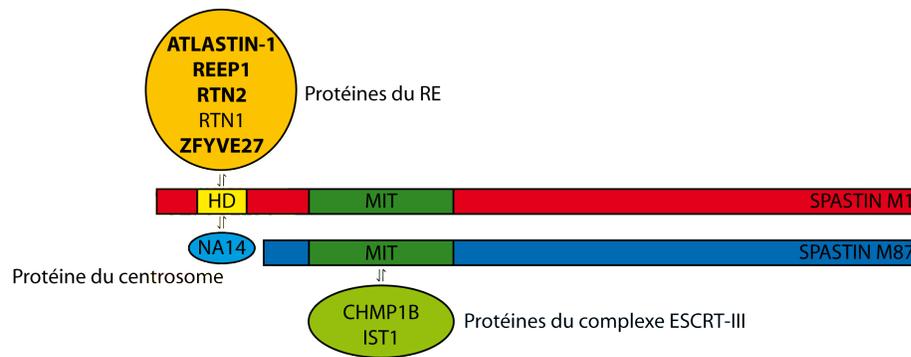


FIGURE 36 – **Représentation schématique des interactants de la spastin.** Les protéines qui interagissent avec le domaine hydrophobe de la spastin M1 ou avec le domaine MIT commun à M1 et M87 sont regroupées selon leur appartenance à un complexe ou un compartiment cellulaire donné. Les protéines impliquées dans d'autres formes de PSH sont indiquées en caractères gras.

Il est intéressant de noter que la moitié des partenaires d'interaction de la spastin déjà identifiés ont été impliqués dans d'autres formes génétiques de PSH révélant l'importance de ces complexes protéiques et des mécanismes cellulaires qu'ils régissent dans l'homéostasie des faisceaux cortico-spinaux. En outre, la majorité de ces partenaires semblent intervenir dans deux grands processus cellulaires interconnectés : la morphogénèse du RE et le trafic endosomal. Brièvement, la spastin ou plus précisément son isoforme M1 interagit avec cinq protéines localisées au niveau des tubules du RE et essentielles à la morphogénèse de cet organite (Tableau 5). Au sein de ce complexe protéique, on retrouve quatre protéines de PSH dont l'atlastin-1 qui n'est autre que la protéine la plus fréquemment incriminée dans les PSH-AD après la spastin. Par ailleurs, une mutation pathogène dans *SPG3A* codant l'atlastin-1 (c.ins1688A) abolit son interaction avec M1, ce qui renforce le rôle crucial de ce complexe protéique dans la maintenance des faisceaux cortico-spinaux (Evans *et al.*, 2006). De plus, M1 et M87 interagissent par l'intermédiaire de leur domaine MIT avec deux membres du complexe ESCRT-III, dont l'activité de scission des membranes est essentielle à l'abscission du midbody lors de la cytodierèse (Reid *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2008; Agromayor *et al.*, 2009; Connell *et al.*, 2009; Renvoisé *et al.*, 2010) ainsi qu'à l'homéostasie du trafic endosomal (Allison *et al.*, 2013). L'importance de ce complexe dans la pathogénèse des formes de PSH liées à *SPG4* est en outre accentuée par l'identification de mutations dans le domaine MIT de la spastin qui abolissent son interaction avec

LES PSH LIÉES AU GÈNE *SPG4*

le complexe ESCRT-III. Enfin, la spastin interagit avec NA14 ou SSNA1 (pour Sjögren's Syndrome Nuclear Autoantigen 1; Errico *et al.*, 2004; Goyal *et al.*, 2014), une protéine du centrosome encore mal caractérisée et récemment impliquée dans la cytotdièrèse des cellules mitotiques et la croissance axonale des neurones (Goyal *et al.*, 2014).

Partenaire	Lien avec la PSH?	Domaine d'interaction	Spécificité isoforme?	Localisation subcellulaire	Fonction	Référence
atlastin-1	<i>SPG3A</i>	HD	M1	RE, Golgi, endosomes	Morphogénèse des tubules du RE, Trafic des récepteurs aux BMPs	Zhu <i>et al.</i> , 2006; Evans <i>et al.</i> , 2006; Sanderson <i>et al.</i> , 2006; Orso <i>et al.</i> , 2009; Hu <i>et al.</i> , 2009; Park <i>et al.</i> , 2010; Fassier <i>et al.</i> , 2010
REEP1	<i>SPG31</i>	HD	M1	RE, mitochondrie, microtubules	Morphogénèse des tubules du RE et interaction RE/microtubules, Points de contacts RE/mitochondrie, Fission mitochondriale	Park <i>et al.</i> , 2010; Klecker <i>et al.</i> , 2014; Krols <i>et al.</i> , 2016
reticulon2	<i>SPG12</i>	1-86; HD?	M1	RE	Formation et courbure des tubules du RE, Organisation du cytosquelette, Trafic des mitochondries	Montenegro <i>et al.</i> , 2012; O'Sullivan <i>et al.</i> , 2012
reticulon1	-	1-300; HD?	M1?	RE	Formation et courbure des tubules du RE, Trafic membranaire	Mannan <i>et al.</i> , 2006a; Chiurchiù <i>et al.</i> , 2016
ZFYVE27	<i>SPG33</i> ?	1-300; HD?	M1?	RE, endosomes	Morphogénèse du RE, Trafic des endosomes de recyclages, Croissance axonale	Mannan <i>et al.</i> , 2006b; Martignoni <i>et al.</i> , 2008; Zhang <i>et al.</i> , 2012; Hashimoto <i>et al.</i> , 2014; Chang <i>et al.</i> , 2013
CHMP1B	-	MIT	M1 et M87	endosomes, midbody (ESCRT-III)	Invagination et scission des membranes lors de la formation des corps multivésiculaires et la cytotdièrèse	Reid <i>et al.</i> , 2005; Yang <i>et al.</i> , 2008; Agromayor <i>et al.</i> , 2009; Connell <i>et al.</i> , 2009; Renvoisé <i>et al.</i> , 2010
IST1	-	MIT	M1 et M87	endosomes, midbody (ESCRT-III)	Fission des tubules endosomaux de recyclage, trafic de récepteurs (TFR), Invagination et scission des membranes lors de la formation des corps multivésiculaires et la cytotdièrèse,	Agromayor <i>et al.</i> , 2009; Renvoisé <i>et al.</i> , 2010; Allison <i>et al.</i> , 2013
NA14	-		M1 et/ ou M87 ?	centrosomes	Cytodièrèse, Croissance axonale	Errico <i>et al.</i> , 2004; Goyal <i>et al.</i> , 2014

TABLE 5 – **Partenaires d'interaction de la spastin.** La localisation sub-cellulaire, le domaine d'interaction avec la spastin ainsi que la fonction des partenaires sont ici répertoriés. La nomenclature SPG est mentionnée si le partenaire est impliqué dans une forme de PSH. Les références en bleu font référence aux articles démontrant une interaction directe entre la spastin et son partenaire d'interaction.

IV.D Des fonctions cellulaires diverses

Au vu de sa localisation subcellulaire, de ses partenaires d'interaction et des nombreuses analyses fonctionnelles réalisées ces dix dernières années à l'aide de systèmes biologiques complémentaires, on peut conclure que la spastin joue un rôle clé dans la régulation de deux processus cellulaires intimement liés et déterminants pour l'homéostasie du trafic vésiculaire : la dynamique des microtubules et le remodelage membranaire.

IV.D.1 La cassure des microtubules : une activité à l'origine de toutes les fonctions de la spastin

IV.D.1.a Evidences *in vitro* Si le rôle de la spastin dans la régulation de la dynamique des microtubules a été suggéré dès son identification par son homologie avec la samouraï katanin, les premières évidences fonctionnelles de son lien avec les microtubules (MTs) proviennent des travaux pionniers d'Errico *et al.* (2002) qui ont montré que la surexpression de la spastin sauvage induit un désassemblage massif du réseau de microtubules, suggestif d'une activité dépolymérisante. En outre, il a été établi que la spastin interagit avec les MTs via son extrémité N-terminale et que cette interaction dynamique est régulée par l'activité ATPase de sa cassette AAA (Errico *et al.*, 2002). En effet, des formes pathogènes de la spastin arborant une mutation faux-sens dans le domaine AAA perdent leur capacité à désassembler le réseau de MTs et restent liées à ces polymères de manière constitutive (Errico *et al.*, 2002). La première description d'une activité de cassure des MTs vient des travaux princeps publiés en 2005 par deux équipes indépendantes qui montrent *in vitro* que la spastin est capable, en présence d'ATP, de générer des cassures internes le long de MTs stabilisés au taxol et fixés sur lames de verre, un phénomène qui va conduire à leur dépolymérisation complète en moins de deux minutes (Figure 37; Evans *et al.*, 2005; Roll-Mecak and Vale, 2005).

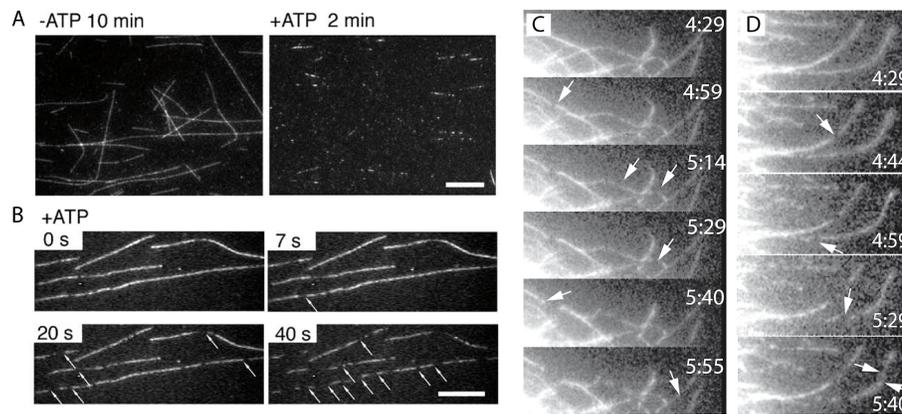


FIGURE 37 – **La spastin casse les microtubules *in vitro*.** (A,B) L'activité de cassure des microtubules portée par la spastin est dépendante de l'ATP. (A) Microtubules purifiés et marqués par la rhodamine que l'on observe désassemblés par la spastin de drosophile en présence d'ATP. (B) Dynamique des cassures (flèches). Extrait de Roll-Mecak and Vale 2005. (C,D) Cassures des microtubules marqués à la GFP dans des cellules en culture. Dynamique des cassures (flèches). Extrait de Evans *et al.* 2005.

De plus, certaines mutations pathogènes localisées dans le domaine AAA et abolissant l'activité ATPase de la spastin abrogent son activité de cassure des MTs (Evans *et al.*, 2005; Roll-Mecak and Vale, 2005). Depuis ces découvertes, plusieurs études parallèles ont permis de disséquer les mécanismes moléculaires sous-tendant la cassure des MTs par la spastin (voir ci-dessus la description du processus de cassure des MTs; White *et al.*, 2007; Roll-Mecak and Vale, 2008; Eckert *et al.*, 2012). Comme prévu, compte tenu de l'importance des interactions de charge entre certains résidus des domaines Ploop de la spastin et ceux de la queue C-terminale de la tubulin dans ce processus de cassure, les modifications post-traductionnelles de la tubulin, plus particulièrement fréquentes au niveau de sa queue C-terminale, vont jouer un rôle essentiel dans la régulation de l'activité de la spastin. En effet, l'ajout de longues chaînes de Glutamates au niveau des résidus Glutamates de la queue C-terminale de la tubulin, catalysées par les enzymes de polyglutamylation TLL6 et TLL11 (Tubulin Tyrosine Ligase-Like 6 et 11) stimule la cassure des MTs par la spastin *in vitro* (Lacroix *et al.*, 2010). Dans ce sens, une étude très récente de Valenstein et Roll-Mecak (2016) compare cette polyglutamylation de la tubulin à un « rhéostat » permettant de moduler de façon

subtile l'activité de cassure de la spastin. En effet, il est montré que l'activité de cassure de la spastin augmente proportionnellement au nombre de résidus Glutamates présents sur la queue C-terminale de la tubulin jusqu'à l'atteinte d'un seuil critique où ces modifications post-traductionnelles deviennent alors inhibitrices (Figure 38 ; Valenstein and Roll-Mecak, 2016).

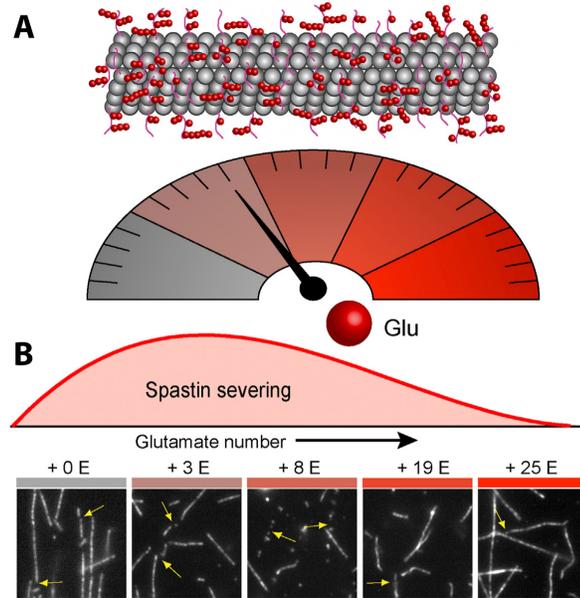


FIGURE 38 – **La polyglutamylation régule l'activité de cassure de la spastin.** (A) Les chaînes de Glutamates (en rouge) ajoutées par les polyglutamylases de type TTLL au niveau de la queue C-terminale de la tubulin sont exposées à la surface des MTs. (B) Le modèle du rhéostat. L'activité de cassure de la spastin augmente proportionnellement au nombre de résidus Glutamates ajoutés à la queue C-terminale de la tubulin jusqu'à un certain seuil où cette longue chaîne de Glutamates devient inhibitrice. Les flèches jaunes pointent les cassures générées par la spastin sur les microtubules polyglutamylés et stabilisés au taxol. Extrait de Valenstein and Roll-Mecak 2016.

En outre, il est intéressant de noter que l'activité de cassure de l'isoforme courte de la spastin est plus efficace que celle de l'isoforme longue. En effet, lorsqu'elles sont surexprimées à des niveaux équivalents dans des fibroblastes de rats, la densité du réseau de MTs est considérablement réduite et les MTs résiduels apparaissent plus courts et clairsemés dans les cellules surexprimant l'isoforme courte de souris (M85), par rapport à celles surexprimant la forme longue (M1) (Solowska *et al.*, 2008). Néanmoins, la surexpression de la forme longue porteuse d'une mutation pathogène affectant un résidu du domaine Ploop semble avoir un effet plus délétère sur la dynamique des MTs que la surexpression de l'isoforme courte arborant cette même mutation (Solowska *et al.*, 2014).

Enfin, certaines expériences suggèrent que la spastin pourrait jouer un rôle dans la stabilisation et la fasciculation des MTs à l'image de certaines MAPs (Microtubule Associated Proteins), et ce, indépendamment de son activité de cassure et de son activité ATPase : (i) lorsque la spastin recombinante est incubée *in vitro* avec des MTs stabilisés au taxol, sans ATP ou en présence d'un analogue non métabolisable de l'ATP, les MTs apparaissent fasciculés (Salinas *et al.*, 2005) ; (ii) lorsqu'elles sont surexprimées, certaines formes pathogènes de la spastin dépourvues de l'activité ATPase décoorent une sous-population de MTs fasciculés, positifs pour des marqueurs de longévité de ces polymères comme la glutamylation et résistants à la dépolymérisation induite par le nocodazole (Errico *et al.*, 2002; Evans *et al.*, 2005). Cependant, des études complémentaires s'avèrent indispensables pour clarifier la relevance physiologique du rôle de la spastin dans la fasciculation des MTs et déterminer si cette protéine est capable de réguler la balance entre les différentes sous-populations de MTs dans les neurones.

IV.D.1.b Evidences *in vivo* Les premières évidences d'un rôle de la spastin dans la régulation de la dynamique des MTs *in vivo* émanent des travaux réalisés chez la drosophile. En effet, chez la mouche, l'expression dans les neurones d'un siRNA (small interfering RNA) dirigé contre la spastin, ou d'une forme pathogénique de cette protéine dépourvue d'activité ATPase, engendre une stabilisation anormale du réseau de MTs au niveau des terminaisons présynaptiques des jonctions musculaires de la larve couplée à des défauts locomoteurs et une réduction de l'espérance de vie chez les mouches adultes. Ces phénotypes peuvent être sauvés par l'administration de drogues dépolymérisant les MTs comme le nocodazole ou la vinblastine (Figure 39 ; Trotta *et al.*, 2004; Orso *et al.*, 2005). A l'inverse, la surexpression de la spastin sauvage dans les neurones de drosophile engendre une diminution importante de la quantité de tubulin stable au niveau des terminaisons présynaptiques ; ce phénotype peut être sauvé par un traitement au taxol, un agent pharmacologique stabilisant les MTs (Trotta *et al.*, 2004). En outre, les neurones corticaux des souris *knockout* pour la *spastin* présentent des dilatations axonales qui se forment régulièrement dans une région distale de l'axone (située à environ 100 μ m du cône de croissance) caractérisée par une transition soudaine entre des MTs stables (détyrosinés) et des MTs dynamiques (tyrosinés) (Figure 39 ; Tarrade *et al.*,

2006). De plus, au sein de ces neurones mutants, le réseau de MTs apparaît anormalement stable et désorganisé (Figure 39), et une quantité massive d'organites et de neurofilaments se retrouvent accumulés, ce qui suggère une altération du transport axonal (Fassier *et al.*, 2013). En outre, les dilatations axonales observées résultent d'une stabilisation anormale du réseau de MTs qui est mise en évidence par la résistance accrue des MTs à la dépolymérisation induite par le nocodazole et par la diminution importante du nombre de bouts « + » en croissance. Cette étude démontre également qu'il est possible de sauver le phénotype pathologique des neurones mutants et de diminuer de 95% le nombre de ces dilatations axonales en modulant la dynamique de ces polymères à l'aide de drogues spécifiques (Figure 39 ; Fassier *et al.*, 2013). Des dilatations axonales similaires ont été décrites dans des cultures de neurones différenciés *in vitro* à partir de cellules souches pluripotentes induites (ou iPSC pour induced Pluripotent Stem Cells) de patients *SPG4* (Denton *et al.*, 2014; Havlicek *et al.*, 2014). De même, le *knockdown* de la Spastin chez l'embryon de poisson-zèbre engendre une diminution dramatique du nombre de bouts « + » en croissance dans les axones des neurones moteurs spinaux, ce qui a des répercussions directes sur la dynamique du cône de croissance (Figure 39 ; Butler *et al.*, 2010).

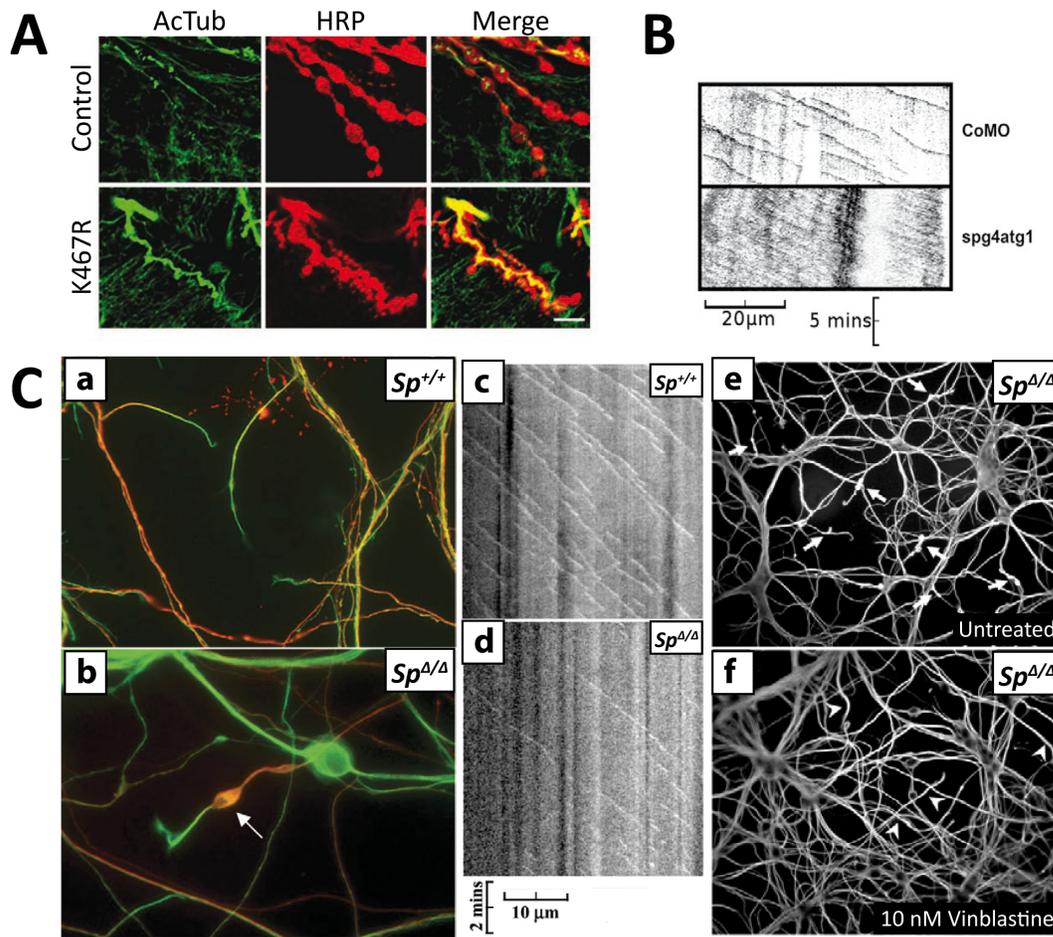


FIGURE 39 – La spastin régule la dynamique des microtubules *in vivo*. (A) Immunohistochemie montrant l'état de la jonction neuromusculaire de drosophile (anti HRP) avec ou sans une forme pathogénique (K467R) de la spastin. L'expression de la forme pathogénique dépourvue d'activité ATPase entraîne une stabilisation anormale du réseau de MTs au niveau des terminaisons présynaptiques. (B) Kymographes représentant la progression des bouts « + » des MTs le long d'un axone moteur de l'embryon de poisson-zèbre. Le *knockdown* de la spastin (noté *spg4atg1*) engendre une diminution dramatique du nombre de bouts « + » en croissance dans ces axones comparés aux axones contrôles (COMO). (C) (a,b) Immunohistochemie sur des cultures de neurones cortico-spinaux de souris *Sp*^{Δ/Δ} (b) et contrôles (a). Les neurones mutants présentent des dilatactions axonales qui se forment systématiquement dans une région distale de l'axone caractérisée par la transition entre des MTs stables (détyrosinés, en rouge) et des MTs dynamiques (tyrosinés, en vert). (c,d) Kymographes représentant la progression des bouts « + » des MTs le long d'axones cortico-spinaux *Sp*^{Δ/Δ} (d) et contrôles (c). On note une forte réduction de la dynamique des bouts « + » chez les neurones mutants en culture. (e,f) Le nombre de dilatactions axonales (e) est fortement réduit chez les souris *Sp*^{Δ/Δ} après un traitement à la vinblastine (f). Modifiés de Orso *et al.* 2005; Butler *et al.* 2010; Tarrade *et al.* 2006; Fassier *et al.* 2013.

Ainsi, toutes les données accumulées par l'analyse fonctionnelle de la spastin chez différents modèles animaux s'accordent à souligner l'importance de cette MSE dans le maintien d'un réseau de MTs dynamiques dans les axones. En effet, à l'inverse de la fidgetin, qui semble restreindre la quantité de microtubules labiles dans les neurones (Leo *et al.* 2015), la spastin limite la quantité de MTs stables en cassant préférentiellement les MTs dits « âgés » et polyglutamylés. La stabilisation anormale du réseau de MTs représenterait donc une cause primaire de la dégénérescence axonale des neurones cortico-spinaux dans les PSH liées à des mutations de *SPG4*. En outre, ces perturbations de la dynamique des microtubules dans les neurones de mammifères dépourvus de spastin sont étroitement liées à des anomalies du transport axonal antérograde et rétrograde, qui sont détectées par un ralentissement du transport de certains organites et/ou une altération de leur distribution subcellulaire selon les études (McDermott *et al.*, 2003; Tarrade *et al.*, 2006; Kasher *et al.*, 2009; Fassier *et al.*, 2013; Denton *et al.*, 2014; Havlicek *et al.*, 2014). Il est intéressant de noter ici que les deux études anatomopathologiques post-mortem de cas de PSH liées à *SPG4* ont révélé des défauts de distribution des mitochondries ainsi que des dilatations axonales gorgées d'organites et de neurofilaments, similaires à celles observées chez la souris, renforçant la notion de conservation inter-espèces des mécanismes pathogéniques associés à la perte de fonction de la spastin (Wharton *et al.*, 2003; Kasher *et al.*, 2009).

IV.D.2 Remodelage et trafic membranaire

IV.D.2.a Trafic endosomal Depuis la découverte en 2003 d'un domaine MIT (Microtubule-Interacting and Trafficking) dans sa séquence primaire (Cicarelli *et al.*, 2003), la spastin a été suspectée de jouer un rôle dans le trafic endosomal à l'image d'autres protéines arborant ce même domaine comme vps4, SKD1 ou SNX15. Bien que cette hypothèse fut étayée en 2005 par l'identification de son premier partenaire d'interaction, CHMP1B, un membre du complexe ESCRT-III participant au trafic endosomal (Reid *et al.*, 2005), et par sa colocalisation subcellulaire avec certains marqueurs endosomaux (Reid *et al.*, 2005; Svenson *et al.*, 2005), ce n'est qu'en 2013 que les premières évidences fonctionnelles établissent l'implication de cette MSE dans la régulation du trafic endosomal *in vitro* et *in vivo* dans des neurones moteurs (Allison *et al.*, 2013). En effet, ces travaux

issus d'une étroite collaboration entre le groupe d'Evan Reid et notre équipe ont déterminé le rôle clé de la spastin dans la régulation de la fission des tubules endosomaux et identifié son interaction avec la protéine IST1, un autre membre du complexe ESCRT-III. En outre, cette interaction avec le complexe ESCRT-III et l'activité de cassure des MTs portée par la spastin se sont révélées cruciales pour la réalisation de cette fonction de fission des tubules endosomaux (Figure 40 ; Allison *et al.*, 2013).

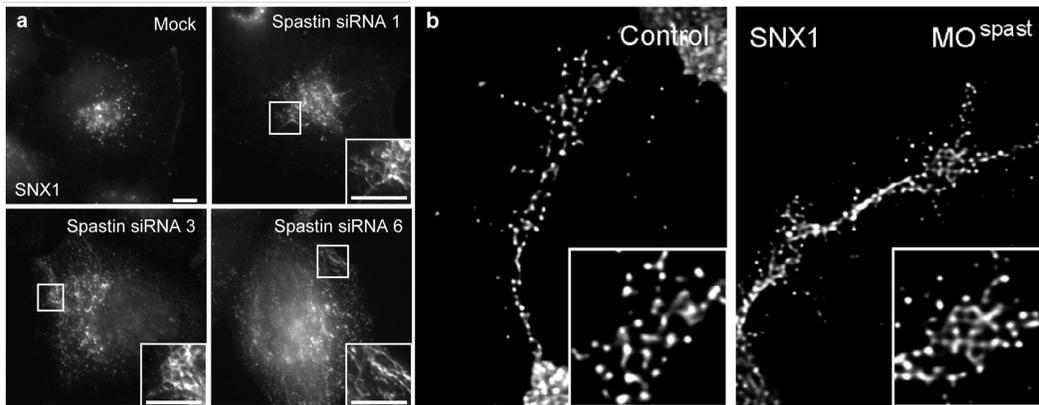


FIGURE 40 – **La spastin régule la fission des tubules endosomaux.** Immunodétection de SNX1, un marqueur des tubules endosomaux (a) dans des cellules HeLa transfectées avec trois siRNAs différents dirigés contre la spastin ou un siRNA contrôle, et (b) dans des cultures primaires de neurones moteurs spinaux issues d'embryons injectés ou non (Control) avec un morpholino ciblant l'ATG1 de la spastin (MO^{spast}). Le *knockdown* de la spastin dans ces deux types cellulaires conduit à une tubulation anormale des endosomes (encarts) comparée aux cellules contrôles. Modifié de Allison *et al.* 2013.

En effet, contrairement à la spastin sauvage (isoformes M1 ou M87), la spastin porteuse d'une mutation pathogène inhibant son interaction avec IST1 ou son activité ATPase est incapable de sauver les défauts de tubulation des endosomes précoces associés au *knockdown* de la spastin endogène, alors qu'un traitement au nocodazole, qui dépolymérise les MTs, restaure totalement le phénotype physiologique. De plus, dans les cellules HeLa déficientes en spastin, ces anomalies de tubulation sont associées à des défauts de recyclage des récepteurs à la transferrin, qui se retrouvent adressés de façon anormale à la voie endo-lysosomale de dégradation, ce qui souligne l'importance de ces événements de fission des tubules dans l'homéostasie du trafic endosomal. En outre, ces travaux montrent que la protéine IST1 est essentielle au recrutement des isoformes M1 et M87 de la spastin

aux endosomes précoces et que le *knockdown* d'IST1 altère la fission des tubules endosomaux et le recyclage des récepteurs à la transferrin de façon similaire à la perte de la spastin (Allison *et al.*, 2013). Ce processus de fission endosomale par le complexe spastin/IST1 s'avère également déterminant pour l'homéostasie des neurones moteurs puisque le *knockdown* des orthologues de spastin ou d'IST1 chez l'embryon de poisson-zèbre engendre des défauts de tubulation des endosomes précoces au niveau des cônes de croissance des neurones moteurs spinaux couplés à des anomalies de trajectoires axonales de ces neurones (Allison *et al.*, 2013).

IV.D.2.b Remodelage du Réticulum Endoplasmique Le domaine transmembranaire de type Hairpin, spécifique à l'isoforme M1 de la spastin, permet à cette forme longue d'être recrutée au niveau du RE par le biais de ses interactions avec l'atlastin-1, REEP1 et certains reticulons, avec lesquelles elle forme un complexe macromoléculaire essentiel à la morphogénèse des tubules du RE (Connell *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2010). Si le rôle des reticulons et de REEP1 dans la formation des tubules du RE (Voeltz *et al.*, 2006) et celui de l'atlastin-1 dans la fusion de ces tubules et la mise en place des jonctions à trois voies caractéristiques de l'organisation polygonal du REL (Hu *et al.*, 2009; Orso *et al.*, 2009) a été clairement établi, le rôle exact de M1 dans la morphogénèse du RE demeure peu documentée. Néanmoins, certaines données de surexpression de formes mutantes de la spastin dans des cellules non neuronales suggèrent qu'elle puisse contrôler la morphogénèse du RE en lien avec le cytosquelette de MTs. En effet, la surexpression de l'isoforme M1 dépourvue de son activité ATPase engendre une expansion anormale des tubules du RE et leur redistribution le long des faisceaux de microtubules (Park *et al.*, 2010). A l'inverse, les tubules du RE se rétractent suite à la surexpression de la protéine M1 sauvage (Lumb *et al.*, 2012). Or, la morphologie et la distribution du RE à travers le cytoplasme sont intimement liées aux MTs et à leur dynamique. En effet, l'élongation des tubules du RE semble être réalisée grâce à deux processus dépendant des MTs : (i) les tubules peuvent croître en glissant le long de MTs préexistants (Friedman *et al.*, 2010) ou (ii) s'accrocher aux bouts « + » des microtubules en croissance pour croître avec eux (Waterman-Storer and Salmon, 1998). Il est donc envisageable que l'activité de cassure des MTs portée par la spastin soit requise pour réguler l'un de ces processus et restreindre la tubulation du RE de la même façon

qu'elle contrôle la fission des tubules endosomaux (Allison *et al.*, 2013). Cependant, aucune donnée physiologique ne permet à ce jour de confirmer le rôle de la spastin endogène dans la morphogénèse des tubules du RE, ni d'établir de lien entre les défauts de remodelage membranaire de cet organe et l'axonopathie des PSH liées au gène *SPG4*.

IV.D.2.c Homéostasie des gouttelettes lipidiques Pour continuer dans la diversité fonctionnelle de la spastin, après transfection, l'isoforme M1 exogène semble également se localiser au niveau des gouttelettes lipidiques (LD pour Lipid Droplets) qui correspondent à des compartiments de stockage des lipides formés à partir des tubules du RE. En effet, l'isoforme M1 de spastin est acheminée dans les LD par le RE, probablement via son domaine Hairpin qui semble indispensable à cette localisation. Ce domaine transmembranaire s'avère suffisant pour adresser une protéine rapportrice aux LD et la mutation d'un de ces acides aminés affecte l'adressage de M1 aux LD. En outre, la surexpression de l'isoforme M1 dans des cellules HeLa induit l'augmentation de la taille des LD tout en réduisant leur nombre (Figure 41 ; Papadopoulos *et al.*, 2015).

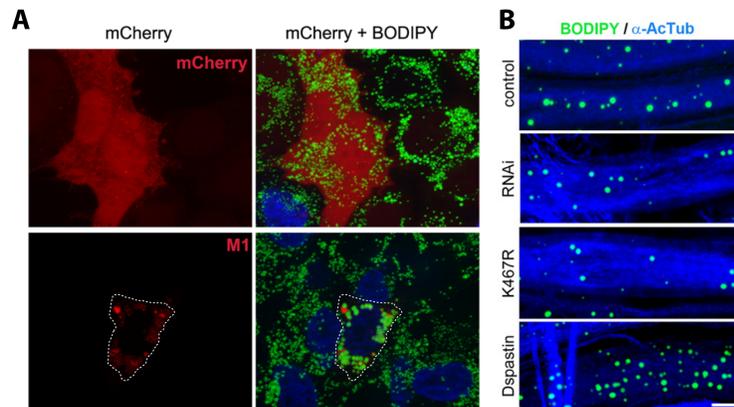


FIGURE 41 – **La spastin M1 régule la taille et la distribution des gouttelettes lipidiques.** Le marqueur BODIPY permet d'observer (en vert) les gouttelettes lipidiques. (A) Cellules HeLa surexprimant la mCherry seule (panels du haut) ou fusionnée à l'isoforme M1 de la spastin (en rouge, panels du bas). La surexpression de la spastin M1 entraîne la fusion des gouttelettes lipidiques. (B) Nerfs des ganglions ventraux de drosophile déplétés en spastin (RNAi) ou surexprimant la Dspastin sauvage ou une forme mutée (K467R). On remarque une diminution du nombre de LD chez les larves exprimant la forme mutée de spastin ou déplétées alors que sa surexpression entraîne une augmentation de la taille et du nombre de LD. Extrait de Papadopoulos *et al.* 2015.

Le rôle physiologique de la spastin dans l'homéostasie des LD et le métabolisme des lipides est renforcé par les travaux menés *in vivo* chez la drosophile et le nématode. Suite à une surexpression ubiquitaire de la D-spastin, les LD contenues dans les corps gras de la drosophile apparaissent plus grosses et moins nombreuses, alors que le taux de TAG (TriAcyLGlycérol, autrefois nommé « triglycéride ») augmente significativement. De façon contrastée, la surexpression de la D-spastin ciblée dans le muscle ou dans les nerfs accroît le nombre de LD dans ces tissus alors que la perte de fonction de cette MSE ou l'expression d'une forme dominante négative dépourvue de l'activité ATPase réduit le nombre de LD ainsi que les taux de TAG dans ces tissus (Papadopoulos *et al.*, 2015). Enfin, la perte de fonction de la spastin (siRNA et mutation nulle) réduit considérablement la quantité des réserves lipidiques chez *C. elegans*. L'ensemble de ces données suggère qu'à l'image de son rôle dans la fission des tubules endosomaux, l'activité de cassure des MTs de la spastin pourrait également réguler les événements de fusion et de fission membranaires participant à la formation des LD et à l'accroissement de leur taille (Gao and Goodman, 2015; Thiam and Forêt, 2016). Toutefois, le lien entre des perturbations de l'homéostasie des LD et la dégénérescence axonale des PSH demeure jusqu'ici encore obscur.

IV.D.2.d Cytodiérèse et reformation de l'enveloppe nucléaire De par sa capacité à interagir avec le complexe ESCRT-III, et plus particulièrement avec la protéine IST1, la spastin est également recrutée au niveau du midbody et au voisinage de la chromatine à la fin de l'anaphase et lors de la cytotiérèse, où elle coordonne, avec le complexe ESCRT-III, le remodelage des membranes et des MTs nécessaires à reformation de l'enveloppe nucléaire et à l'étape finale d'abscission des cellules filles (Connell *et al.*, 2009; Vietri *et al.*, 2015). Bien que ces données puissent paraître éloignées de la physiopathologie de maladies neurodégénératives comme les PSH, elles renforcent toutefois l'hypothèse selon laquelle un dysfonctionnement du remodelage membranaire serait à l'origine des PSH liées au gène *SPG4* et permettent de préciser certains aspects mécanistiques sous-tendant la spécificité fonctionnelle de la spastin.

IV.D.3 Fonction nucléaire : la spastin, un facteur de transcription ?

Etonnamment, bien que la spastin possède deux domaines NLS lui permettant d'être acheminée dans le noyau (Claudiani *et al.*, 2005), aucune étude fonctionnelle n'a jusqu'ici permis de déterminer si elle exerce une fonction précise dans ce compartiment cellulaire ou si elle doit juste transiter par le noyau afin d'être active dans le cytoplasme. Cependant, la présence d'un domaine leucine zipper et HbH (Hélice-boucle-Hélice) dans sa structure primaire suggère qu'elle puisse se lier à l'ADN, voire participer à la régulation de l'expression génique comme un facteur de transcription, au même titre que d'autres protéines AAA (Joly *et al.*, 2012). Une étude publiée en 2011 a montré que la spastin agirait comme un co-répresseur de HOXA10 (Homeobox A10), un facteur de transcription nécessaire au développement utérin et à l'implantation de l'embryon (Daftary *et al.*, 2011). En effet, le complexe HOXA10 est connu pour réprimer un gène de l'endomètre, EMX2 dont l'expression est inversement proportionnelle au taux d'implantation (Taylor and Fei, 2005). La spastin forme un complexe avec HOXA10 qui se fixe sur le promoteur du gène EMX2 pour réprimer sa transcription, et cet effet répresseur est aboli suite au *knockdown* ou à la mutation des NLS de la spastin (Daftary *et al.*, 2011). Il serait donc intéressant de déterminer si la spastin peut réguler l'expression d'autres gènes essentiels au développement, à la maintenance et/ou à la plasticité des neurones cortico-spinaux et si l'altération de cette fonction éventuelle peut contribuer au phénotype pathologique des patients *SPG4*.

V Les différents modèles d'étude

V.A Les modèles *SPG4* de drosophile

Différents modèles *SPG4* ont été générés chez la mouche grâce à l'utilisation du système de transgénèse inductible *UAS/GAL4*. La perte de fonction ubiquitaire de la spastin est létale au stade pupal, établissant le rôle crucial de cette protéine au cours du développement embryonnaire de la drosophile (Trotta *et al.*, 2004). En revanche, les mouches exprimant, dans leurs neurones, un siRNA

dirigé contre la spastin ou une forme pathogène de cette protéine dépourvue d'activité ATPase (le mutant K467R) présentent des phénotypes cellulaires, électrophysiologiques et comportementaux très similaires entre eux, et réciproques de ceux observés lors de la surexpression de la spastin sauvage dans les neurones (Trotta *et al.*, 2004; Orso *et al.*, 2005). En outre, un mutant nul de la spastin (*spastin*^{5.75}) a également été obtenu par transgénèse insertionnelle (Sherwood *et al.*, 2004). L'introduction chez ce mutant *spastin*^{5.75} de deux transgènes exprimant une forme sauvage de la spastin humaine arborant ou non le polymorphisme S44L ou P45Q et une forme pathogène (K388R) sous le contrôle d'un promoteur UAS, a permis de générer différents modèles de drosophile « humanisés » pour *SPG4* (Du *et al.*, 2010; Baxter *et al.*, 2014). Les caractéristiques phénotypiques majeures de ces différents modèles sont répertoriées dans le Tableau 6. Les anomalies des jonctions neuromusculaires et les défauts comportementaux observés chez ces différents modèles de drosophile sont liés à des perturbations de la dynamique des MTs et peuvent être diminués ou restaurés dans les modèles *UAS/GAL4* par un traitement avec des agents pharmacologiques ciblant spécifiquement ces polymères (Trotta *et al.*, 2004; Orso *et al.*, 2005) ou suite à une exposition au froid (18°C au lieu de 24°C) pour les mouches mutantes *spastin*^{5.75} (Baxter *et al.*, 2014). Enfin, le phénotype locomoteur de deux nouvelles mouches transgéniques exprimant spécifiquement une forme pathogène de M1 ou de M87 dans les neurones suggère un effet plus délétère de l'isoforme longue mutante (Solowska *et al.*, 2014).

Manipulation génétique		Phénotype	Référence
<i>knockdown</i>	Elav:GAL4 ; UAS:Dspastin-RNAi	-Réduction de l'aire synaptique à la JNM -Stabilisation anormale des MTs à la JNM -Augmentation des courants synaptiques à la JNM -Défauts locomoteurs -Diminution de l'espérance de vie	Trotta et al., 2004; Orso et al., 2005
		-Réduction de l'aire synaptique -Accumulation de tubulin stable à la JNM -Défauts locomoteurs -Diminution de l'espérance de vie	
Surexpression	Elav:GAL4 ; UAS:DspastinK467R	-Diminution de la taille et augmentation du nombre de boutons synaptiques -Diminution de la neurotransmission -Diminution de la quantité de MTs stables à la JNM -Troubles sévères de la locomotion -Diminution de l'espérance de vie -Défauts de régénération axonale après axotomie	Sherwood et al., 2004; Orso et al., 2005; Du et al., 2010; Stone et al., 2012; Baxter et al., 2014
Mutation nulle	<i>Dspastin</i> ^{5.75}	-Diminution de la taille et augmentation du nombre de boutons synaptiques -Défaut locomoteur moins sévère (v/s <i>Dspastin</i> ^{5.75}) -Diminution de la quantité de MTs stables à la JNM -Globalement plus modéré	Du et al., 2010
Forme « humanisée » <i>H</i> ^{WT} , <i>H</i> ^{K388R}	<i>Dspastin</i> ^{5.75} ; UAS:spastin <i>H</i> ^{WT} ; UAS:spastin <i>H</i> ^{K388R}	-Diminution de la quantité de MTs stables à la JNM -Troubles très sévères de la locomotion -Diminution drastique de l'espérance de vie	
Forme « humanisée » <i>H</i> ^{L44} , <i>H</i> ^{K388R}	<i>Dspastin</i> ^{5.75} ; UAS:spastin <i>H</i> ^{L44} ; UAS:spastin <i>H</i> ^{K388R}	-Exacerbation des phénotypes subcellulaires (MTs) et cellulaires	
Forme « humanisée » <i>H</i> ^{Q45} , <i>H</i> ^{K388R}	<i>Dspastin</i> ^{5.75} ; UAS:spastin <i>H</i> ^{Q45} ; UAS:spastin <i>H</i> ^{K388R}	-Diminution de la neurotransmission à la JNM -Diminution de la quantité de MTs stables à la JNM	Trotta et al., 2004
Surexpression	Elav:GAL4 ; UAS:Dspastin	-Défauts de posture -Défauts locomoteurs sévères	Solowska et al., 2014
Surexpression	Elav:GAL4 ; UAS:spastinM1C448Y	-Défauts locomoteurs plus modérés	

TABLE 6 – Présentation des différents modèles *SPG4* de drosophile et de leurs phénotypes. MT, microtubule ; JNM, jonction neuromusculaire.

En conclusion, ces modèles drosophiles qui récapitulent certaines des caractéristiques majeures des PSH sont des outils puissants pour entreprendre des cribles génétiques en vue d'identifier des modificateurs du phénotype ou tester certaines molécules à visées thérapeutiques.

V.B Le modèle poisson-zèbre *SPG4*

Il n'existe à ce jour aucun mutant *SPG4* chez le poisson-zèbre. Les études fonctionnelles réalisées jusqu'ici chez ce téléosté se sont appliquées à caractériser les conséquences du *knockdown* de la Spastin au cours du développement embryonnaire, suite à l'injection d'oligonucléotides antisens (ou morpholinos ; Wood *et al.*, 2006; Butler *et al.*, 2010). Deux types de morpholinos ont été utilisés,

l'un ciblant le site d'initiation de la traduction, l'autre un site d'épissage du transcrit *SPG4* chez le poisson-zèbre (Wood *et al.*, 2006). Les embryons injectés avec ces deux morpholinos (appelés morphants *spastin*) présentent des phénotypes cellulaires et locomoteurs similaires. Brièvement, ces morphants sont incapables d'éclore au stade larvaire et la majorité d'entre eux sont immobiles et présentent une queue anormalement courbe (Wood *et al.*, 2006). Au niveau cellulaire, le *knockdown* de la spastin affecte de façon dramatique la croissance axonale des neurones moteurs spinaux et de certains branchiomotoneurones ainsi que la formation des jonctions neuromusculaires (Wood *et al.*, 2006). De plus, le défaut de croissance axonale des motoneurones s'accompagne d'une réduction importante de la dynamique des microtubules (diminution du nombre de bout « + » en croissance; Butler *et al.*, 2010) et d'une tubulation excessive des endosomes au sein de ces axones (Allison *et al.*, 2013). Enfin, il est à noter que les morphants spastin présentent une apoptose massive qui s'étend à l'ensemble du système nerveux et dont la spécificité vis à vis de la perte de fonction de la spastin est à prendre avec précaution, sachant que la mort neuronale est l'un des effets « off-target » évidents dus à l'usage des morpholinos (Wood *et al.*, 2006).

V.C Les modèles murins *SPG4*

Trois modèles distincts de souris *SPG4* ont été générés à ce jour (Tableau 7). La lignée KO *Sp*^{Δ/Δ} créée à l'aide du système Cre-loxP est porteuse d'une délétion constitutive des exons 5-7 qui conduit à la perte d'une partie de la cassette AAA et mime environ 15% des mutations tronquantes retrouvées chez les patients (Tarrade *et al.*, 2006). Le modèle *knockout* publié en 2009, issu d'une mutagenèse à l'ENU, présente, quant à lui, une mutation ponctuelle au niveau du site accepteur d'épissage de l'exon 7 (c.1092 + 2 T>G) qui engendre la perte de l'exon 7 et, de ce fait, la délétion d'une partie de la cassette AAA (Kasher *et al.*, 2009). De façon importante, aucune protéine spastin tronquée n'a été détectée dans les tissus de ces deux modèles confirmant l'effet 'perte de fonction' de ces mutations tronquantes. Enfin, le dernier modèle, publié très récemment est une souris *knock-in spastin*^{N384K/N384K}, générée à l'aide du système de transgénèse FRT/Flp et porteuse d'une mutation ponctuelle (p.N384K) à l'état homozygote, qui abolit l'activité ATPase de la spastin (Connell *et al.*, 2016). Il est important de préciser que les souris hétérozygotes ne semblent présenter aucun

phénotype, comparées aux souris contrôles, ce qui réfute l’hypothèse d’un effet ‘dominant-négatif’ ou ‘gain-de-fonction’ toxique pour cette mutation. Ces trois modèles ont des défauts cellulaires et locomoteurs très similaires, qui récapitulent certaines des principales caractéristiques cliniques et anatomopathologiques de la maladie humaine. Toutefois, l’étendue de la dégénérescence axonale et la sévérité de l’atteinte locomotrice sont beaucoup plus modérées chez ces mutants murins homozygotes que chez les patients porteurs de mutations hétérozygotes, suggérant l’existence de mécanismes compensatoires chez ces rongeurs.

Manipulation génétique	Phénotype	Référence	
<i>knockout</i> <i>Sp^{Δ/Δ}</i>	délétion des exons 5-7	-Axonopathie progressive restreinte au SNC -Présence d’axones dilatés gorgés d’organites et de neurofilaments dans les faisceaux moteurs et sensoriels de la ME dès 4 mois, aggravation avec l’âge -Déclin des performances motrices sur tapis roulant dès 15 mois et altération de la marche à 22 mois -Dilatations axonales dans les cultures primaires de neurones corticaux -Stabilisation anormale du réseau de MTs dans les axones -Défaut de transport axonal rétrograde dans la partie distale de l’axone et dans les dilatations -Sauvetage des dilatations axonal avec des drogues ciblant les MTs	Tarrade et al., 2006; Fassier et al., 2013
<i>knockout</i> <i>Spast^{ΔE7/ΔE7}</i>	perte de l’exon 7	-Présence d’axones dilatés gorgés d’organites et de neurofilaments dans la substance blanche de la ME dès 3 mois, aggravation avec l’âge -Détérioration de la marche dès 7 mois -Dilatations axonales dans les cultures primaires de neurones corticaux -Réduction du transport axonal rétrograde dans la dilatation et altération du transport antérograde dans les axones non dilatés	Kasher et al., 2009
<i>knock-in</i> <i>spastin^{N384K/N384K}</i>	Mutation ponctuelle (p.N384K)	-Dilatations axonales dans les cultures primaires de neurones corticaux -Détérioration progressive de la marche à partir de 4 mois	Connell et al., 2016

TABLE 7 – Présentation des différents modèles murins associés au gène *SPG4* et de leurs phénotypes locomoteurs et neuropathologiques. SNC : système nerveux central ; ME : moelle épinière ; MTs : microtubules.

V.D Les cellules iPSC de patients

Ces trois dernières années, différents groupes indépendants se sont attelés à développer et caractériser des modèles cellulaires humains à partir de cellules souches de la muqueuse nasale (ONS) ou d’iPSC (pour ‘induced Pluripotent Stem Cells’, ou cellules souches pluripotentes induites) de patients atteints de PSH liées à *SPG4*.

Les neurones télencéphaliques glutamatergiques différenciés *in vitro* à partir d'iPSC d'un patient porteur d'une mutation tronquante affectant un site d'épissage (c.683 - 1 G>T) et de deux patients porteurs de la mutation non-sens p.R562X présentent des dilatations axonales, où s'accumulent différents organites et des marqueurs de stabilité des MTs, et qui s'apparentent à celles observées chez les modèles murins *SPG4* (Tableau 8; Denton *et al.*, 2014; Havlicek *et al.*, 2014). Il est important de noter que le phénotype pathologique de ces neurones humains peut être sauvé par la réexpression de l'isoforme longue (M1) ou courte (M87) de la spastin (Havlicek *et al.*, 2014). Ces données de sauvetage impliquent que le phénotype observé ne résulte vraisemblablement pas du dysfonctionnement de certains processus cellulaires régulés spécifiquement par M1, comme la morphogénèse du RE ou la formation des gouttelettes lipidiques. En outre, les neurones corticaux différenciés *in vitro* à partir de cellules souches embryonnaires humaines (hESC) et transfectées avec un siRNA contre la spastin, développent des dilatations axonales en tout point similaires à celles observées dans les neurones glutamatergiques différenciées à partir d'iPSC de patients (Denton *et al.*, 2014). Ces dilatations axonales des neurones corticaux apparaissent significativement réduites après un traitement à la vinblastine, une drogue modulant la dynamique des MTs (Denton *et al.*, 2014). Enfin, au sein des neurones différenciés *in vitro* à partir de cellules souches dérivées de la muqueuse nasale olfactive de patients, qu'ils soient porteurs de mutations faux-sens ou tronquantes, le transport axonal des peroxysomes est fortement altéré et semble à l'origine d'un stress oxydatif (Wali *et al.*, 2016). Ces deux phénotypes couplés peuvent être restaurés par un traitement à l'Epothilone D, un agent pharmacologique qui stabilise les MTs (Wali *et al.*, 2016).

Manipulation génétique	Phénotype	Référence
Fibroblastes ↓ iPSC ↓ Neurones glutamatergiques	-épissage (c.683 -1 G>T) -non-sens (p.R562X)	-Défauts de croissance neuritique -Dilatations axonales avec accumulation d'organelles et de MTs stables -Augmentation de la quantité de tubulin acétylée -Altération du transport axonal des mitochondries
hESC ↓ neurones corticaux	<i>knockdown spastin</i>	-Dilatations axonales, réduites par un traitement à la vinblastine
Muqueuse olfactive ↓ ONS ↓ Différenciation neuronale	-épissage (c.1413 +3_+6del) -faux sens (p.L195V), (p.E366K),(p.E464D)	-Altération du trafic des peroxyosomes dans les neurites -Diminution du nombre de peroxyosomes dans les processus neuritiques -Stress oxydatif

TABLE 8 – Présentation des différents modèles neuronaux différenciés à partir de cellules souches de patients *SPG4* ou d'individus contrôles ayant subi un *knockdown* de la spastin endogène, et brève description de leurs phénotypes.

En conclusion, les modèles animaux et cellulaires générés ces dix dernières années ont considérablement enrichi nos connaissances fonctionnelles de la spastin, et ont ainsi contribué à une meilleure compréhension des mécanismes pathogéniques à l'origine des formes *SPG4* de PSH. En outre, la caractérisation de différents modèles *SPG4* a permis de révéler une conservation inter-espèce remarquable des mécanismes pathogéniques à l'origine des altérations neuronales de ces modèles et s'accorde à montrer que la stabilisation excessive du réseau de MTs est une cause primaire de l'atteinte neuronale dans ces affections.

Chapitre III

OBJECTIFS DE LA THÈSE

La cassure des microtubules (MTs) fut initialement décrite comme un processus rapide et abrupt dont on était loin de percevoir les subtilités en termes de régulation de la dynamique de ces polymères dans différents mécanismes cellulaires. On sait aujourd'hui qu'il s'agit en réalité d'un évènement très complexe dont l'objectif princeps est de réguler finement la dynamique de polymérisation et de dépolymérisation du réseau de MTs, notamment en libérant certains MTs de leur point d'ancrage ou en générant de nouvelles extrémités polarisées. Le remodelage des éléments structurant l'axone, en première ligne desquels on trouve les MTs, est un prérequis à la croissance axonale et à la formation de nouveaux branchements (Dent *et al.*, 2011). Ainsi, les enzymes de cassure des MTs (ou MSE pour Microtubule Severing Enzymes), et plus particulièrement la spastin et la p60-katanin, jouent un rôle primordial dans le développement du système nerveux en assurant la dynamique appropriée du cytosquelette au sein de l'axone et du cône de croissance, qui sous-tend la formation des circuits neuronaux.

En effet, il a été montré que le réseau de MTs tient une place essentielle dans le guidage axonal puisque c'est la stabilisation asymétrique de ces composants du cytosquelette d'un côté du cône de croissance qui pilote les changements de direction de ce dernier lors de sa migration (Buck and Zheng, 2002; Conde and Cáceres, 2009). Or, bien que la fonction de la spastin et de la p60-katanin

dans l'élongation axonale ait été étudiée dans divers systèmes *in vitro* comme *in vivo* (Ahmad *et al.*, 1999; Karabay *et al.*, 2004; Wood *et al.*, 2006; Riano *et al.*, 2009; Butler *et al.*, 2010; Vitriol and Zheng, 2012), leur rôle dans la navigation et le cheminement de l'axone suivant une route précise jusqu'à ses cellules cibles n'avait jamais été décrit à ce jour.

C'est pourquoi, au début de ma thèse, nous nous sommes interrogés sur **un rôle éventuel de ces deux MSE dans le processus de navigation axonale, et ce, *in vivo*, chez un organisme vertébré particulièrement adapté pour étudier la mise en place des circuits neuro-naux : l'embryon de poisson-zèbre. Comment la spastin et la p60-katanin participent-elles au processus de guidage axonal ? Et dans la mesure où elles sont présentes simultanément dans les mêmes neurones embryonnaires, possèdent-elles des fonctions redondantes ou à contrario travaillent-elles séparément à différents « postes » de l'axone et de son extrémité, le cône de croissance ?**

En outre, au cours des dix dernières années, un niveau supplémentaire de régulation du réseau de MTs par leurs protéines associées (ou MAPs pour « Microtubules Associated Proteins ») a été révélé : l'existence d'un « code tubulin » qui détermine les interactions des différentes MAPs sur les MTs, et contrôle de ce fait la dynamique de ces polymères a été démontrée par des études *in vitro* comme *ex* ou *in vivo* (Janke and Kneussel, 2010; Janke, 2014). La tubulin subit en effet des modifications post-traductionnelles (MPT) variées comme l'acétylation, la polyglutamylation, la détyrosination, etc. qui permettent de définir des sous-populations différentes de MTs et ainsi de réguler l'accès des MAPs et MSE aux MTs. La polyglutamylation de la tubulin, qui constitue la MPT la plus fréquemment observée dans le système nerveux embryonnaire et adulte (Audebert *et al.*, 1994), contrôle l'affinité des MSE pour les MTs ainsi que leur activité de cassure de ces polymères (Lacroix *et al.*, 2010; Valenstein and Roll-Mecak, 2016). Cependant, **le rôle de la polyglutamylation de la tubulin au cours de la croissance et de la navigation des axones, et en lien avec la régulation de l'activité des MSE**, demeure inexploré.

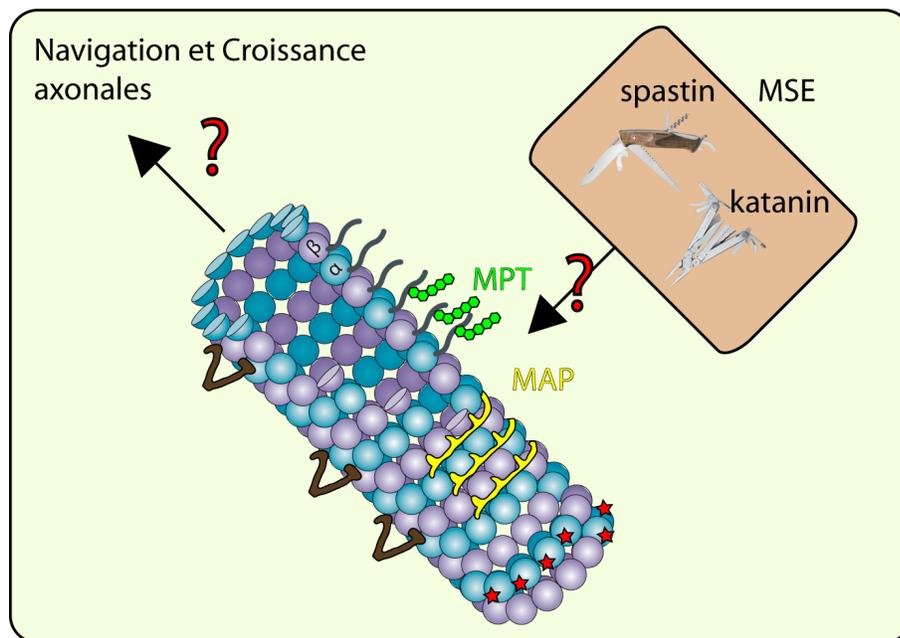


FIGURE 42 – **Quel est le rôle de la spastin et de la p60-katanin dans la mise en place des circuits neuronaux ?** Comment sont-elles régulées par les modifications post-traductionnelles (MPT) et/ou les protéines associées aux microtubules (MAP) ? Leur activité de cassure des MTs s'exerce-t-elle de façon similaire et aux mêmes étapes du développement du système nerveux ? Sont-elles redondantes ?

Dans cette première partie de ma thèse, où j'ai été associé, avec un autre doctorant de l'équipe, Daniel Ten Martin, à une étude questionnant la redondance fonctionnelle des deux MSE majoritaires du système nerveux, la spastin et la p60-katanin, dans l'établissement des circuits moteurs de la moelle épinière au cours du développement du poisson-zèbre. En outre, nous avons cherché à préciser l'influence que peut avoir la polyglutamylation catalysée par deux des enzymes TTL (pour Tubulin Tyrosine Ligase-Like) sur l'activité de ces deux MSE, et par ce biais sur la croissance et la navigation axonales des neurones moteurs spinaux.

Dans la deuxième partie de ma thèse, mon sujet principal a consisté à réaliser une analyse comparative de la fonction des deux isoformes majeures de la spastin au cours du développement du téléosté. En effet, et bien que la spastin ait été intensivement étudiée en raison de son implication dans la forme la plus fréquente de PSH, **les rôles spécifiques des deux isoformes majoritaires M1 et M87 de cette MSE, ainsi que leurs contributions respectives à la pathogénèse des PSH,**

n'avaient pas été explorés. Sachant que l'isoforme courte (M87) de la spastin est strictement contenue dans l'isoforme longue (M1), M87 n'a pas de partenaire spécifique ni de motif peptidique propre. A l'inverse, l'isoforme longue de la spastin possède des motifs spécifiques comme le domaine transmembranaire (Park *et al.*, 2010), une des deux séquences de localisation nucléaire (NLS ; Beetz *et al.*, 2004; Claudiani *et al.*, 2005) et ses deux signaux d'export nucléaire chevauchants (Claudiani *et al.*, 2005), ainsi que des partenaires qui interagissent de manière sélective avec cette forme M1, incluant entre autres l'atlastin-1, une autre protéine de PSH. De plus, des polymorphismes situés en amont de la Methionine 87, et en particulier les variants S44L et P45Q (Svenson *et al.*, 2004), ont été associés à des formes plus précoces et plus sévères de PSH. Au vu de leur localisation dans la séquence primaire de la spastin, ces variants n'influenceraient donc que l'isoforme longue ou bien le ratio entre les isoformes M1 et M87 (Mancuso and Rugarli, 2008).

Jusqu'ici, un certain nombre de limitations techniques ont empêché l'analyse fonctionnelle comparative de ces deux isoformes dans les modèles utilisés. En effet, comme ces deux isoformes sont issues du même transcrit, les modèles animaux ou cellulaires, qui permettaient d'appréhender la fonctionnalité de la spastin par des études de perte ou de gain de fonction, concernaient la spastin dans son intégralité et donc l'ensemble de ses isoformes sans distinction. Au cours de mon doctorat, je me suis donc attaché à cibler le plus spécifiquement possible l'un ou l'autre **des sites d'initiation de la traduction (ATG1/M1 et ATG2/M87)** à l'aide d'oligonucléotides antisens ou morpholinos, qui bloqueraient majoritairement la traduction de l'isoforme M1 ou celle de M87. De plus, nous avons cherché à déterminer dans quelle(s) grande(s) voie(s) moléculaire(s) pourraient s'intégrer les deux isoformes majeures de la spastin. En effet, à l'instar de l'atlastin-1 (Fassier *et al.*, 2010), un des partenaires d'interaction de M1, il a été suggéré par une étude *in vitro* que la spastin agirait comme un inhibiteur de la signalisation des Bone Morphogenetic Proteins (ou BMP ; Tsang *et al.*, 2009). Si la spastin inhibe réellement cette voie *in vivo*, ses deux isoformes participent-elles de concert à cette régulation ? Ou est-ce plus spécifiquement une propriété de l'isoforme M1 ? Et dans ce cas, M87 s'intègre-t-elle dans une autre voie de signalisation et laquelle ?

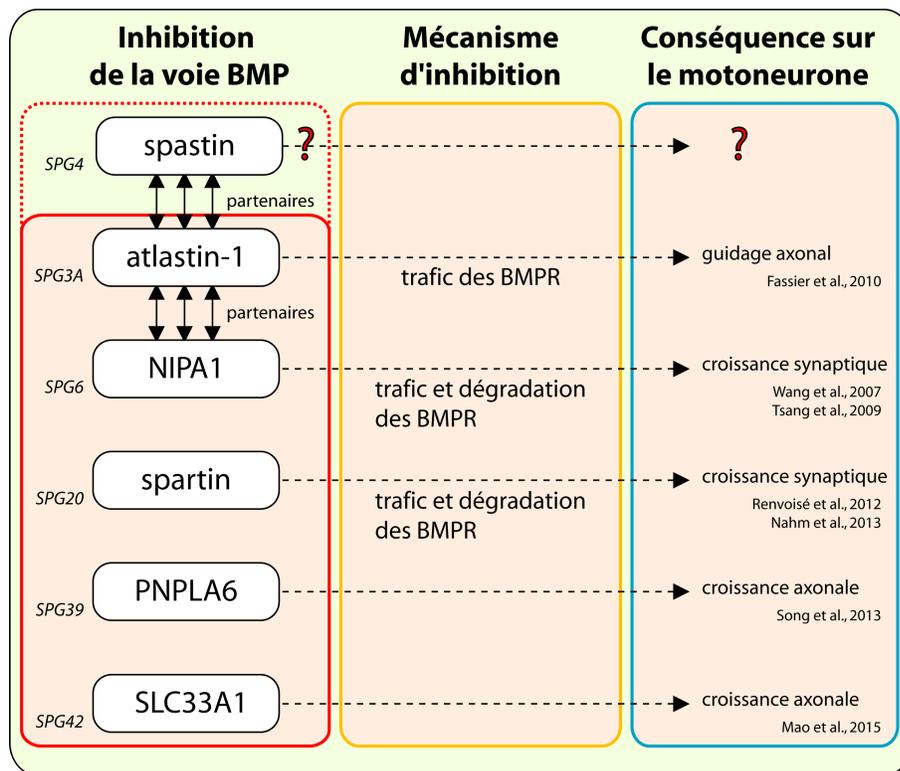


FIGURE 43 – La spastin régule-t-elle la voie des BMP comme d'autres protéines de PSH ? Si oui, est-ce que ses deux isoformes sont impliquées dans cette voie, ou seule M1, partenaire d'interaction de l'atlastin-1, est-elle concernée ? Et à plus longs termes, quel serait l'étendue de l'implication de la voie des BMP dans la pathogénèse des PSH ?

Deuxième partie

RÉSULTATS

A key role for p60-Katanin in motor axon targeting is conditioned by tubulin polyglutamylase TLL6

Daniel Ten Martín¹, Nicolas Jardin¹, François Giudicelli², Laïla Gasmi¹, Carsten Janke³, Coralie Fassier^{*,1,†} and Jamilé Hazan^{*,1,†}

1. Sorbonne Universités, UPMC Université Paris 06, INSERM U1130, CNRS UMR8246, Neurosciences Paris Seine - Institut de Biologie Paris-Seine (NPS-IBPS), 75005 Paris, France
2. Sorbonne Universités, UPMC Université Paris 06, CNRS UMR7622, INSERM, Biologie du Développement Paris Seine - Institut de Biologie Paris-Seine (LBD-IBPS), 75005 Paris, France
3. Institut Curie, CNRS UMR3306, INSERM U1005, Centre Universitaire, Bâtiment 110, F-91405 Orsay, France

† These authors contributed equally.

*Corresponding author. Tel: +33 1 44 27 32 72; Fax: +33 1 44 27 25 02; E-mail: jamile.hazan@upmc.fr

*Corresponding author. Tel: +33 1 44 27 44 21; Fax: +33 1 44 27 25 02; E-mail: coralie.fassier@upmc.fr

Running title: Katanin and TLL6 in motor axon navigation

Keywords: axon targeting / microtubules / p60-katanin / TLL / zebrafish

Abstract

The instructive role of microtubules and the subsequent involvement of their post-translational modifications and interacting proteins in neuronal circuit wiring have gradually emerged over the past decade. In embryonic neurons, microtubule-severing enzymes, p60-katanin and spastin, were shown to act in axon elongation and branching processes but their suspected role in axon navigation has never been established. Using loss-of-function analyses during development of the zebrafish, we here show that p60-Katanin is required for spinal motor axon targeting in a dose-dependent manner and that the axon pathfinding defects caused by its knockdown directly impact on zebrafish larval mobility. We further ascertain that Spastin and p60-Katanin have differential roles in motor axon navigation and identify TLL6-mediated microtubule polyglutamylation as a key event in regulating p60-Katanin activity during this axon targeting process. Finally, our *in vivo* characterisation of TLL6 and TLL11 reveals that these two highly related polyglutamylases play distinct functions in microtubule-mediated motor axon navigation.

Introduction

In the past decade, microtubules (MTs) have progressively emerged as key players in different steps of nervous system development, including neuronal polarisation and migration, dendritic spine formation and axon outgrowth and guidance (Conde and Caceres, 2009; Hoogenraad and Bradke, 2009; Dent *et al.*, 2011). The instructive role of MTs in axon pathfinding was initially postulated, since stabilising MTs on one side of a growth cone was sufficient to induce its turning *in vitro* (Buck and Zheng, 2002). MT dynamics and orientation within growth cones were subsequently shown to be sensitive to axon guidance cues such as Netrin-1, Semaphorin-3a or Wnt3a *in vitro* (Dent *et al.*, 2004; Purro *et al.*, 2008). Concomitantly, few MT-associated proteins were identified as major determinants in growth cone steering and axon guidance decisions during vertebrate or invertebrate embryogenesis (Rothenberg *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2004; Del Rio *et al.*, 2004; Lewcock *et al.*, 2007; Dent *et al.*, 2011). The current focus on these underground MT-interacting players in axon naviga-

ation sheds light upon the regulatory mechanisms that tightly control their activity within growth cones, with a special emphasis on tubulin post-translational modifications (PTM). Polyglutamylation, catalysed by the tubulin tyrosine ligase-like (TTLL; van Dijk *et al.*, 2007) enzymes, is the most abundant neuronal tubulin PTM (Audebert *et al.*, 1994). However, the conceivable function of polyglutamylation in axon outgrowth via the regulation of neuronal MT interactors, and in particular through its impact on MT-severing activity (Lacroix *et al.*, 2010; Valenstein and Roll-Mecak, 2016), has never been explored.

Katanin, the first MT-severing enzyme to be identified (Hartmann *et al.*, 1998), was shown to play a central role in neuronal morphogenesis, migration and plasticity (Sharp and Ross, 2012; Eom *et al.*, 2014). Furthermore, its neuronal MT-releasing activity from centrosomes was found to be required for axon outgrowth *in vitro* (Ahmad *et al.*, 1999). In developing rodent neurons, the expression levels of p60-katanin, the subunit that bears the MT-severing activity, are highly enriched during the axon outgrowth phase but drastically drop as axons reach their target cells (Karabay *et al.*, 2004). These expression data together with the established role of p60-katanin in axon extension and branching (Ahmad *et al.*, 1999; Karabay *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 2008; Butler *et al.*, 2010) prompted us to examine whether katanin-mediated MT severing controls growth cone directional steering and targeting as hypothesized in Vitriol and Zheng (2012). Furthermore, the impact of tubulin polyglutamylation and acetylation on spastin and p60-katanin MT-severing activity (Lacroix *et al.*, 2010; Sudo and Baas, 2010; Valenstein and Roll-Mecak, 2016) has hinted at the potential influence of these tubulin PTMs on the sensitivity and function of various MT interactors (Janke, 2014) in the wiring of neuronal circuitry.

During zebrafish embryogenesis, p60-Katanin and its closely related MT-severer Spastin play a central role in motor axon elongation (Wood *et al.*, 2006; Butler *et al.*, 2010). To characterise the role of p60-Katanin in axon targeting, we analysed its loss-of-function phenotypes at different stages of zebrafish development, focussing on axon pathfinding defects and their consequences on larval behaviour. Using rescue experiments, we show that Spastin MT-severing activity is unable to correct the axon pathfinding errors caused by the depletion of p60-Katanin, and identifies TTLL6-mediated tubulin polyglutamylation as a key regulator of p60-Katanin function in this axon targeting process.

Finally, our functional analysis of the zebrafish polyglutamylases TTLL6 and TTLL11 reveals their crucial role in axon navigation, and provides the first *in vivo* evidence that these two closely related polyglutamylation enzymes show distinct functions in the MT-mediated wiring of vertebrate motor circuits.

Results

***p60-Katanin* knockdown alters zebrafish spinal motor axon outgrowth and targeting in a dose-dependent manner**

To further explore the role of zebrafish p60-Katanin in axonogenesis, we performed loss-of-function experiments using various doses of a morpholino oligonucleotide ($\text{MO}^{\text{p60Kat}}$) targeted against *p60-Katanin* translation initiation site. Two distinct doses of $\text{MO}^{\text{p60Kat}}$ (1.3 and 3.4 pmoles), for which injected embryos (termed morphants) appear to develop normally compared to control morpholino-injected siblings (hereinafter designed as MO^{Ctl} or controls), were used to study the developing axonal projections of p60-Katanin-depleted embryos. In view of the involvement of zebrafish p60-Katanin in primary motor axon elongation (Butler *et al.*, 2010) and the enrichment of its transcript in the developing spinal cord at embryonic stages of motor neuron differentiation and axon outgrowth (Supplementary Fig S1), we started our characterisation of the two classes of morphants ($\text{MO}^{\text{p60Kat}/1.3\text{pmol}}$ and $\text{MO}^{\text{p60Kat}/3.4\text{pmol}}$) by labelling primary and secondary motor neurons (pMN and sMN) at two developmental stages. At 26 hours post-fertilisation (hpf), control pMNs had extended their axons both ventrally and dorsally along the myotome (Fig 1A), while ventrally-projecting $\text{MO}^{\text{p60Kat}/1.3\text{pmol}}$ pMNs (i.e., CaP neurons) were abnormally branched at their distal end (arrowheads, Fig 1A) and a significant proportion of $\text{MO}^{\text{p60Kat}/3.4\text{pmol}}$ CaP axons appeared truncated (asterisks, Fig 1A). This stump phenotype is highly reminiscent of the axon elongation defects reported by Butler *et al.* (2010). Quantification of $\text{MO}^{\text{p60Kat}/1.3\text{pmol}}$ branches and $\text{MO}^{\text{p60Kat}/3.4\text{pmol}}$ stumps in 24 hemisegments (n=32 embryos for each class of morphant and control embryos) revealed that $\text{MO}^{\text{p60Kat}/1.3\text{pmol}}$ CaP axons had twice more distal branches than control and $\text{MO}^{\text{p60Kat}/3.4\text{pmol}}$

axons (Fig 1B, $p \leq 0.001$) whereas 34% of $MO^{p60Kat/3.4pmol}$ CaP axons appeared truncated compared to 4% and 6% of CaP stumps in MO^{Ctl} and $MO^{p60Kat/1.3pmol}$ respectively (Fig 1C, $p \leq 0.001$). To determine whether these pMN axon branching and elongation defects were specifically assigned to the gradual reduction of p60-Katanin levels, we performed rescue experiments by co-injecting two doses (120 and 180 pg) of the *KATNA1* transcript encoding human p60-katanin with the MO^{p60Kat} . We initially established that single injection of 120 or 180 pg of *KATNA1* mRNA had no obvious consequence on zebrafish embryonic morphology and behaviour, nor on spinal motor neuron development. Notably, 120 pg of *KATNA1* mRNA fully rescued the hyperbranching of $MO^{p60Kat/1.3pmol}$ pMN axons (Fig 1A and 1B, morphants versus doubly injected embryos: $p \leq 0.001$), while 180 pg of *KATNA1* transcript was sufficient to reduce by 75% the number of stumps in $MO^{p60Kat/3.4pmol}$ (Fig 1A and 1C, morphants versus doubly injected embryos: $p \leq 0.001$).

To investigate the axon architecture of late-born motor neurons in the two sets of morphants, we selectively labelled sMN neurons at 72 hpf using a specific marker of these neurons (Zn-5 antibody) in Tg(*Hb9*:GFP) transgenic larvae. At this stage, control sMN axons had grown along the pathway pioneered by pMN axons, fasciculated with them to form the ventral, dorsal (arrow, Fig 2A) and rostral (arrowheads, Fig 2A) nerves and reached their final muscle destination. $MO^{p60Kat/1.3pmol}$ larvae showed abnormal dorsal projections with subsets of axons parting from the main fascicle and forming additional aberrant tracts (empty thick arrows, Fig 2A) in 21% of spinal hemisegments (Fig 2B), while the dorsal projections were totally absent in 45% of $MO^{p60Kat/3.4pmol}$ hemisegments (Fig 2A and 2C). These distinctive defects of sMN dorsal tracts in the two sets of morphants were rescued by the two doses of *KATNA1* mRNA (120 pg for $MO^{p60Kat/1.3pmol}$ and 180 pg for $MO^{p60Kat/3.4pmol}$; Fig 2A-2C), establishing that both the misguided and split dorsal projections in $MO^{p60Kat/1.3pmol}$ larvae and their apparent inability to grow in $MO^{p60Kat/3.4pmol}$ larvae are specifically due to a dose-dependent lack of p60-Katanin. Quantification of these sMN dorsal tract defects in 20 hemisegments per larva ($n=32$ in each set of control, morphant and rescued larvae) showed significant differences between morphants and control or rescued larvae (Fig 2B and 2C; $p \leq 0.001$). Moreover, $MO^{p60Kat/3.4pmol}$ and to a lesser extent $MO^{p60Kat/1.3pmol}$ larvae showed a striking and significant guidance defect of sMN rostral axons that aberrantly grew caudally (empty arrowheads in

the morphants versus full arrowheads in the controls, Fig 2A) in 26% of $MO^{p60Kat/3.4pmol}$ and 8.75% of $MO^{p60Kat/1.3pmol}$ spinal hemisegments (Fig 2D). These caudally-oriented ‘rostral’ tracts were diminished by 80% after injection of 180 pg of *KATNA1* mRNA in $MO^{p60Kat/3.4pmol}$ larvae (Fig 2D; $p \leq 0.001$ between morphant and rescued larvae), and by 66% when 120 pg of *KATNA1* transcript were co-injected in $MO^{p60Kat/1.3pmol}$ larvae (Fig 2D; $p \leq 0.05$). Finally, 56% of $MO^{p60Kat/3.4pmol}$ larvae exhibited aberrant ectopic sorting of sMN axons from the spinal cord (asterisk, Fig 2A), which was rarely observed in control and $MO^{p60Kat/1.3pmol}$ larvae, and reduced by 61% in partially rescued larvae (Fig 2E; $p \leq 0.001$). To confirm the prominent axon pathfinding defects with another morpholino directed against *p60-Katanin*, we reiterated our analysis of sMN axon architecture in larvae injected with $MO^{katna1aug1}$ used in Butler *et al.* (2010). Notably, all the sMN axon defects of $MO^{p60Kat/3.4pmol}$ larvae, including caudally oriented ‘rostral’ projections (empty arrowheads, Supplementary Fig S2A and S2B; $p \leq 0.001$), absence of dorsal projections (Supplementary Fig S2A and S2C; $p \leq 0.001$) and axon ectopic sorting from the spinal cord (asterisks, Supplementary Fig S2A) were observed in the same proportion in 72-hpf $MO^{katna1aug1}$ -injected larvae.

To investigate these defects in sMN axon navigation *in vivo*, we monitored spinal motor axon outgrowth from 20 to 72 hpf in control and morphant Tg(*Hb9*:GFP) transgenic embryos using time-lapse videomicroscopy (Supplementary movies S1A-D). In contrast to the highly stereotyped behaviour of MO^{Ctl} -injected sMN axons, showing the rostrally projecting sMN defasciculating, turning anteriorly and immediately refasciculating to form the rostral projection (Supplementary movie S1A), morphant ‘rostral’ nerves failed to refasciculate properly and subsets of axons, parting from the main rostral tract, independently innervated neighbouring areas of the lateral myoseptum (Supplementary movie S1B). Furthermore, our live analysis of the morphants also revealed a misguided ‘rostral’ projection that abnormally turns and extends caudally to innervate inappropriate targets (Supplementary movie S1B). As shown for 21% of $MO^{p60Kat/1.3pmol}$, morphant dorsal sMN axons partially defasciculate and split into two independent tracts that similarly fail to find their proper targets in the dorsal myotome compared to control dorsal tracts (Supplementary movies S1C and 1D).

Altogether, our data show that, in addition to its well-defined role in axon extension, p60-Katanin activity is required for motor axon targeting in a dose-dependent manner.

***p60-Katanin* knockdown causes a severe decrease in larval mobility**

We next investigated whether these defects in motor axon navigation induced any major behavioural effect with a special emphasis on larval locomotor activity. Zebrafish embryos and larvae show a set of stereotyped motor behaviours including the emergence of organized swimming from 27 hpf that requires both pMNs and sMNs (Brustein *et al.*, 2003). We compared control and morphant larval swimming behaviours at 72 hpf using a touch-response test. The two sets of morphant larvae showed a striking loss of motility compared with control larvae, although they clearly responded to touch (Fig 3A and Supplementary movies S2A, S2B and S2D). Quantification of the mean swimming speed and average distance covered by the larvae (Fig 3B and 3C) revealed that both $MO^{p60Kat/1.3pmol}$ and $MO^{p60Kat/3.4pmol}$ morphants swam significantly slower ($p \leq 0.001$; Fig 3C) and over shorter distances ($p \leq 0.001$; Fig 3B) than control larvae. Co-injection of 120 or 180 pg of human *KATNA1* transcript, together with $MO^{p60Kat/1.3pmol}$ or $MO^{p60Kat/3.4pmol}$ respectively, fully restored larval swimming (Fig 3A-C and Supplementary movies S2C and S2E versus morphant mobility in Supplementary movies S2B and S2D). Conversely, injection of zebrafish *spastin* transcript failed to rescue the swimming deficit of *p60-Katanin* morphants. Indeed, larvae doubly injected with 150-200 pg of *spastin* mRNA and 1.3 pmol of MO^{p60Kat} swam as slowly, and over shorter distances, as $MO^{p60Kat/1.3pmol}$ larvae did (Fig 3A-C and Supplementary movie S2F), showing that enhanced MT-severing activity by Spastin cannot compensate for the lack of p60-Katanin in zebrafish larval motor behaviour.

Spastin and p60-Katanin play distinct roles in spinal motor neuron development

Zebrafish Spastin and p60-Katanin were shown to have different but related functions in pMN axon outgrowth as their simultaneous knockdown substantially aggravates the defects in spinal motor axon elongation (Wood *et al.*, 2006; Butler *et al.*, 2010). Furthermore, the overexpression of *spastin* mRNA, unlike human *KATNA1*, was unable to rescue the motility deficit of MO^{p60Kat} -injected lar-

vae. These combined findings prompted us to assess the contingent redundancy of these closely related MT-severers in spinal motor axon targeting by cross-rescue analysis. Given that the injection of 150-200 pg of *spastin* mRNA was unable to rescue the motility deficit of the less severely affected larvae that were injected with the lower doses of morpholino (i.e., 1.3 pmoles), we carried out all cross-rescue experiments at this dose of MO. As shown in Fig 4A and 4B, ventrally-projecting pMN axons of 26-hpf doubly injected ($\text{MO}^{\text{p60Kat}/1.3\text{pmol}} + \textit{spastin}$ mRNA) embryos exhibit similar aberrant branches and in the same proportion ($p=0.968$; $n=20$ for each set of embryos) as in $\text{MO}^{\text{p60Kat}/1.3\text{pmol}}$ embryos (i.e., twice more than the controls, $p\leq 0.001$). Likewise, no significant difference was observed for each sMN axon pathfinding defect between 72-hpf doubly injected and $\text{MO}^{\text{p60Kat}/1.3\text{pmol}}$ larvae (split and misguided dorsal tracts, empty arrows on Fig 4A, $p=0.934$ between morphant and doubly injected larvae and $p\leq 0.001$ between each of these injected sets and the MO^{Ctl} -injected larvae, Fig 4C; caudally-oriented misguided “rostral” projections, empty arrowheads on Fig 4A, $p=0.977$ between morphant and doubly injected larvae and $p\leq 0.001$ between each of these injected larvae and the controls, Fig 4D; $n=20$ for each set of embryos).

To exclude the possibility of a rapid degradation of either exogenous Spastin or its transcript in injected embryos, and to validate our initial conclusions, we analysed the consequence of *p60-katanin* knockdown in $\text{Tg}(\textit{Hb9}:\text{Gal4};\textit{UAS}:\textit{Spastin-HA})$ double transgenic embryos that mosaically overexpress an HA-tagged version of zebrafish Spastin in some spinal motor neurons. Once again, at 26 hpf, $\text{MO}^{\text{p60Kat}/1.3\text{pmol}}$ CaP axons appeared twice more branched than the control CaP axons, whether they overexpressed Spastin or not (Fig 4E; $n=20$ morphant or control embryos and $n=200$ CaP neurons at least for each of the four classes of pMN, HA-positive or -negative morphants or controls; $p\leq 0.001$ between morphant and control HA+ or HA-CaP axons, Fig 4F). Altogether, these results confirm that Spastin and p60-Katanin play non-overlapping roles in vertebrate motor axon branching and targeting.

The knockdown of MT polyglutamylating enzymes TLL6 and TLL11 affects spinal motor axon targeting

To assess whether this functional difference between p60-Katanin and Spastin could be underlain by their preference for distinct populations of MTs, we investigated one of tubulin post-translation modifications (PTM), the polyglutamylation, known to be enriched in all neuronal compartments (Janke and Kneussel, 2010) and to impact on MT severing (Sharma *et al.*, 2007; Lacroix *et al.*, 2010; Valenstein and Roll-Mecak, 2016). Polyglutamylation of MTs by the long-chain-generating glutamylases, TLL6 and TLL11, was indeed shown to influence MT severing and/or targeting by spastin and p60-katanin (Lacroix *et al.*, 2010). The strong expression of both *tll6* and *tll11* transcripts in the zebrafish developing spinal cord at stages of motor axon outgrowth (Pathak *et al.*, 2011) prompted us to examine whether these two polyglutamylation enzymes could be involved in motor neuron development. We first verified the presence of polyglutamylated MTs in zebrafish spinal motor axons with two antibodies recognizing both long and short chains of glutamates (GT335) or long chains only (polyE). Polyglutamate chains were detected in both pMN axons at 26 hpf and sMN tracts at 72 hpf (Fig 5A and 5B). We next carried out loss-of-function analyses of these polyglutamylases using morpholinos targeted against the translation initiation site of each enzyme, termed MO^{TLL6} and MO^{TLL11} respectively. Following injection of 0.2 pmol of MO^{TLL6} and 0.8 pmol of MO^{TLL11}, both *TLL6* and *TLL11* morphants showed a ventrally curved body axis at 72 hpf (Fig 5C, upper panels), which may be associated with the ciliary defects that were previously described for TLL6 (Pathak *et al.*, 2011) and might suggest a similar involvement of TLL11 in the biogenesis of zebrafish primary cilia. The analysis of spinal motor axon architecture in the two sets of morphants revealed that ventrally projecting pMN axons from CaP neurons showed numerous aberrant branches (arrows, Fig 5C, middle panels) in both *TLL6* and *TLL11* morphants at 26 hpf compared to control embryos (n=30 for each set of embryos; Fig 5D, p≤0.001 between morphants and controls). Furthermore, 18% of CaP axons were truncated in *TLL11* morphants (asterisks, Fig 5C, middle right panel), whereas stumps were observed in only 3-4% of MO^{TLL6}- or MO^{Ctl}-injected spinal hemisegments (Fig 5E, p≤0.001 between MO^{TLL11} and control or MO^{TLL6} embryos). Interestingly, the phenotype of sMN axons in 72-hpf *TLL6* morphant larvae substan-

tially differed from that of sMN projections in *TLL11* morphant larvae, but was reminiscent of sMN axon defects in $MO^{p60Kat/1.3pmol}$ larvae. *TLL6* morphant larvae (n=30) were characterised by split and misguided sMN dorsal tracts (empty arrows, Fig 5C, bottom panels) in 17% of spinal hemisegments (Fig 5F), while these dorsal projections were missing in 60% of *TLL11* morphant hemisegments (n=30 larvae), which was barely observed in control larvae (n=30; Fig 5F and 5H, $p \leq 0.001$ between morphants and controls). Moreover, sMN rostral projections were misguided caudally in 30% of MO^{TLL6} - and 23% of MO^{TLL11} -injected hemisegments (empty arrowheads, Fig 5C, bottom panels; Fig 5G, $p \leq 0.001$ between morphants and controls). Additionally, MO^{TLL11} rostral tracts appeared totally defasciculated (bracket, Fig 5C, bottom right panel) in 31% of *TLL11* morphant hemisegments, which was rarely detected in *TLL6* morphant and control larvae (Fig 5I; $p \leq 0.001$ between MO^{TLL11} and control or MO^{TLL6} larvae). Furthermore, some sMN axons ectopically exited the spinal cord in 87% of *TLL11* morphant larvae (asterisks, Fig 5C, bottom right panels) and to a lesser extent in *TLL6* morphants, which was never observed in control larvae (Fig 5J, $p \leq 0.001$ between MO^{TLL11} and MO^{Ctl} or MO^{TLL6} larvae). *TLL6* and *TLL11* morphant axon phenotypes, although partially overlapping, suggested that these two as yet indistinguishable polyglutamylases could act differentially in spinal motor neuron development. Furthermore, the overlapping defects in motor axon pathfinding between *TLL* and *p60-katanin* morphants, coupled with the known link between MT polyglutamylases and this MT-severing enzyme (Sharma *et al.*, 2007; Lacroix *et al.*, 2010), could hint at a functional interaction in this developmental process.

TLL6 and TLL11 have related but distinct functions in motor axon outgrowth and navigation

To assess the specificity of *TLL6* and *TLL11* morphant phenotypes and to further investigate the role of these related enzymes in spinal motor axon outgrowth, we carried out rescue experiments by co-injecting MO^{TLL6} or MO^{TLL11} with mouse *TLL6* or *TLL11* transcripts. At 72 hpf, the overall curved morphology of *TLL6* and *TLL11* morphants was rescued by injection of 120 pg of mouse *TLL6* and *TLL11* mRNA respectively (Fig 6A and 6B, upper panels). However, over-expression of the same amount of *TLL11* mRNA in MO^{TLL6} -injected larvae failed to rescue the

curved body axis of *TTL6* morphants (Fig 6A, upper panels), while the reciprocal misexpression of *TTL6* mRNA in MO^{TTL11} -injected larvae equally failed to alleviate the morphological phenotype of *TTL11* morphants (Fig 6B, upper panels). We next analysed pMN axon architecture at 26 hpf (Fig 6A and 6B, middle panels) and sMN projections at 72 hpf (Fig 6A and 6B, bottom panels) in each set of injected or doubly injected embryos and larvae. Overexpression of mouse *TTL6* mRNA rescued the hyperbranching of MO^{TTL6} CaP axons at 26 hpf (Fig 6A, middle panels, and Fig 6C; $n=20$ in each set of embryos; $p \leq 0.001$ between morphants and rescued or control embryos), while *TTL11* mRNA failed to attenuate the aberrant branching of *TTL6* morphants (Fig 6A, middle panels, and Fig 6C; $p=0.12$ between *TTL6* morphants and $MO^{TTL6} + TTL11$ mRNA). Likewise, injection of *TTL6* mRNA achieved 58% and 82% reduction in misguided rostral and split dorsal sMN projections respectively (Fig 6A, bottom panels, and Fig 6E-6F; $p \leq 0.05$ for rostral tracts and $p \leq 0.001$ for dorsal tracts), whereas *TTL11* overexpression had no effect on the misrouting of both MO^{TTL6} rostral and dorsal nerves (Fig 6A, bottom panels, and Fig 6E-6F; $p=0.99$ and 0.87 between *TTL6* morphant and “ $MO^{TTL6} + TTL11$ mRNA” rostral and dorsal projections, respectively). Reciprocally, injection of mouse *TTL11* mRNA reduced by 40% and fully rescued the abnormal CaP axon branching (arrows, Fig 6B, middle panels) and stumps (asterisks, Fig 6B, middle panels) of 26-hpf *TTL11* morphants respectively (Fig 6C and 6D; $p \leq 0.001$ between morphants and rescued embryos), while overexpression of *TTL6* transcript did not yield any significant amelioration of MO^{TTL11} pMN axon phenotype (Fig 6B, middle panels, and Fig 6C-6D). Likewise, all sMN axon defects of 72-hpf *TTL11* morphants, including caudally oriented misguided ‘rostral’ projections (empty arrowheads, Fig 6B, bottom panels, and Fig 6F), missing dorsal tracts (Fig 6B, bottom panels, and Fig 6G), defasciculated rostral tracts (Fig 6B, bottom panels, and Fig 6H) and axon ectopic sorting from the spinal cord (asterisks, Fig 6B, bottom panels, and Fig 6I), were significantly attenuated by overexpression of mouse *TTL11* but not by *TTL6* misexpression. Overall, these direct- and cross-rescue analyses thus confirm that *TTL6* and *TTL11* play non-redundant key roles in spinal motor axon extension and navigation.

TLL6-mediated MT polyglutamylation restores normal motor axon targeting and locomotion in *p60-katanin* morphants

The overlapping alterations between *p60-katanin* and *TLL* morphants incited us to assess whether at least one of these polyglutamylases could specifically impact on p60-Katanin activity during zebrafish spinal motor outgrowth. We thus undertook rescue experiments by co-injecting either *TLL6* or *TLL11* mRNA together with $\text{MO}^{\text{p60Kat}/1.3\text{pmol}}$. We first compared the swimming behaviour of control, $\text{MO}^{\text{p60Kat}/1.3\text{pmol}}$ -injected, as well as doubly injected ($\text{MO}^{\text{p60Kat}/1.3\text{pmol}} + \textit{TLL6}$ mRNA) and ($\text{MO}^{\text{p60Kat}/1.3\text{pmol}} + \textit{TLL11}$ mRNA) larvae at 72 hpf using a touch-response test. Injection of 120 pg of mouse *TLL6* transcript, but not *TLL11* mRNA, substantially restored p60-katanin morphant larval swimming (Fig 7A). Furthermore, the overexpression of mouse *TLL6* in $\text{MO}^{\text{p60Kat}/1.3\text{pmol}}$ -injected embryos partially, but significantly, rescued the supernumerary branching of morphant CaP axons at 26 hpf (Fig 7B and 7D, n=20 for each set of embryos; $p \leq 0.001$: morphants versus rescued or control embryos). Similarly, *TLL6* overexpression in 72-hpf *p60-katanin* morphants reproducibly reduced by 61% and 58%, split and misguided dorsal nerves (empty thick arrows, Fig 7C and 7E; n=20 for each set of embryos; $p \leq 0.01$ morphant larvae versus rescued or control larvae), and caudally misrouted “rostral” sMN tracts (empty arrowheads, Fig 7C and 7F; $p \leq 0.001$: morphants versus rescued or control larvae). In contrast, no significant difference in pMN and sMN axon defects was observed between $\text{MO}^{\text{p60Kat}/1.3\text{pmol}}$ -injected and doubly injected ($\text{MO}^{\text{p60Kat}/1.3\text{pmol}} + \textit{TLL11}$ mRNA) 26-hpf embryos and 72-hpf larvae (Fig 7B-7F), indicating that *TLL6*, but not *TLL11*, is selectively able to rescue the phenotype of *p60-katanin* morphants.

Discussion

Among the myriad of molecules shown to play prominent roles in axon extension and navigation, special focus has lately been given to MT interactors due to their evident roles in integrating and transducing extracellular guidance signals into changes in growth-cone morphology, extension and steering (Lowery and Van Vactor, 2009; Dent *et al.*, 2011; Kolodkin and Tessier-Lavigne, 2011). The

MT-severing enzymes, p60-katanin and spastin, are known to be decisive players in axon elongation and branching *in vitro* and *in vivo* (Ahmad *et al.*, 1999; Karabay *et al.*, 2004; Wood *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2008; Riano *et al.*, 2009; Butler *et al.*, 2010). However, despite a body of corroborating evidence for their implication in axon elongation and their enriched localisation in developing axons and growth cones during the whole outgrowth process (Karabay *et al.*, 2004; Errico *et al.*, 2004), the role of these MT-severers in axon navigation and targeting had never been established *in vivo*. Using loss-of-function experiments, we here show that p60-Katanin plays a key role in axon targeting of primary and secondary spinal motor neurons (pMN and sMN) during zebrafish embryogenesis.

The involvement of p60-Katanin in motor axon targeting appears to be dose-dependent, since variations in the knockdown severity lead to different axon pathfinding defects of both pMNs and sMNs. Furthermore, the specificity of these errors in axon targeting has been assigned to the gradual lack of p60-Katanin by rescue analyses with two different doses of human *KATNA1* transcript. Interestingly, two recent studies revealed that the orthologue of p60-katanin in the *Drosophila* exerts a MT-plus-end-depolymerising function in addition to its well known MT-severing activity, and that this newly identified activity regulates MT plus-end interactions with the cell cortex, and thereby cell migration (Zhang *et al.*, 2011; Diaz-Valencia *et al.*, 2011). Moreover, *Drosophila* p60-katanin was shown to catalyse the severing of MTs and the removal of tubulin dimers from MT plus ends, in a concentration-dependent manner *in vitro*. Notably, the maximal depolymerisation rate occurred at a lower concentration compared to the maximal severing rate (Diaz-Valencia *et al.*, 2011). This suggests that p60-katanin may preferentially exert one or the other of its activities depending on its tightly regulated concentration range in different subcellular compartments. This dose-dependent dual function of p60-katanin in the regulation of MT dynamics may, if applicable *in vivo* in a vertebrate model, provide an explanation for the dose-dependent differential effects of *p60-katanin* knockdown in motor axon targeting.

We have further shown that the motor axon navigation defects of *p60-katanin* morphants expectedly impact on zebrafish larval swimming behaviour, and that neither the motor deficit, nor the axon pathfinding phenotype of the morphants could be rescued by the ubiquitous or motoneuron-specific overexpression of zebrafish Spastin. Consistently, spastin and p60-katanin were previously shown to

participate differently in the formation of axonal branches in cultured rodent hippocampal neurons (Yu *et al.*, 2008). The differential role of these MT-severing enzymes in axon branching has been related to the distribution of both spastin at branch formation sites and the MT-stabilising protein Tau along the axon shaft, which more efficiently protects MTs from being severed by p60-katanin than by spastin (Qiang *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2008). Moreover, basic fibroblast growth factor (bFGF) was reported to simultaneously enhance the MT-severing activity of spastin and p60-katanin in cultured neurons, by inducing the phosphorylation and consecutive dissociation of Tau from MTs, thus giving p60-katanin and spastin equal access to MTs (Qiang *et al.*, 2010). Remarkably, interactions between the p60-katanin regulator Tau and MTs can be controlled by tubulin polyglutamylation (Boucher *et al.*, 1994), which may also regulate the activities of MT-severing enzymes (Lacroix *et al.*, 2010; Valenstein and Roll-Mecak, 2016).

Polyglutamylation of MTs generates a huge variety of signals that may fine-tune and coordinate the interactions and activities of MT interactors (Janke, 2014). The tubulin code hypothesis predicts that the variability of this modification, which may generate shorter or longer glutamate chains on either alpha- or beta-tubulin, might create sub-species of MTs that are then functionally distinct (Wehenkel and Janke, 2014). The regulation of these polyglutamylation patterns is expected to come from the selective action of different tubulin glutamylases that generate distinct subtypes of this PTM on MTs (van Dijk *et al.*, 2007). So far, only little is known about the molecular and physiological roles of the tubulin code. In human non-neuronal cells, tubulin polyglutamylation, and in particular the generation of long glutamate side chains, promotes MT severing by spastin and to a lesser extent by p60-katanin (Lacroix *et al.*, 2010), while katanin was suggested to preferentially sever polyglutamylated or polyglycylated MTs in *Tetrahymena* motile cilia (Sharma *et al.*, 2007). Furthermore, a single glutamylase is able to biphasically regulate MT severing by spastin, as a function of the number of glutamates it added per tubulin: spastin activity increases from one to eight glutamates per tubulin, but decreases below this glutamylation threshold (Valenstein and Roll-Mecak, 2016). Interestingly, this biphasic response of a MT interactor to the glutamate chain length was previously shown for the binding affinity between Tau and MTs (Boucher *et al.*, 1994). Thus, the response to glutamate numbers may vary from spastin to p60-katanin, which adds another

level of complexity to the fine-tuning of MT severing activities. When tested *in vitro* or under overexpression conditions, TTLL6 and TTLL11, which both add long glutamate side chains on MTs (van Dijk *et al.*, 2007), equally enhance spastin-mediated MT activity (Lacroix *et al.*, 2010). To further characterise the physiological roles of these polyglutamylases in the regulation of MT severing, we undertook knockdown and rescue analyses of TTLL6 and TTLL11 during development of the zebrafish nervous system. While *in vitro* or in overexpression experiments, both enzymes undistinguishably induced MT severing, our work reveals the differential roles of TTLL6 and TTLL11 *in vivo* during vertebrate neuronal development. Similar regulatory functions of MT PTMs in axon outgrowth have so far only been reported once for MT detyrosination in mouse hippocampal and cerebellar axon projections (Erck *et al.*, 2005; Marcos *et al.*, 2009). The differences in motor axon navigation defects between *TTLL6* and *TTLL11* morphants suggest that these two polyglutamylases contribute to this developmental process with distinct regulatory signals. Moreover, the phenotype similarity between *p60-katanin* and *TTLL* morphants, together with the specific and exclusive rescue of *p60-katanin* morphant axon pathfinding errors and impaired swimming behaviour by *TTLL6* expression, establish that TTLL6-mediated MT polyglutamylation compensates for the lack of p60-katanin activity in these developing neurons. Concomitantly, the inability of TTLL11 to rescue *TTLL6* or *p60-katanin* morphant phenotypes highlights that these two MT polyglutamylases can no longer be considered as redundant on a physiological level, despite their similar enzymatic activities (van Dijk *et al.*, 2007). The characterisation of these subtle differences that are recognised by p60-katanin but not by spastin (Lacroix *et al.*, 2010) will require the generation of new tools to determine with accuracy the number of glutamates added or the exact modification sites targeted by each of these polyglutamylases.

We here demonstrate for the first time an indirect role of MT PTMs in motor axon navigation and targeting, and reveal the differential roles of two biochemically highly similar tubulin glutamylases in fine-tuning the activities of MT interactors. Our results further highlight how subtle differences between tubulin-modifying enzymes, which are not easily assessed by *in vitro* experiments, may lead to eminently different functional readouts under physiological conditions. Our work may thus suggest new avenues of research on the involvement of other tubulin PTMs in axon outgrowth and

guidance, such as MT acetylation, which was shown to influence p60-katanin neuronal activity both *in vitro* and *in vivo* (Sudo and Baas, 2010; Mao *et al.*, 2014). Finally, dissecting the function and regulation of p60-katanin *in vivo* may provide novel mechanistic insights underlying the pathogenesis of human cortical malformations and severe microlissencephaly associated with mutations in the gene encoding its regulatory p80 subunit, which were shown to disrupt the interactions with its p60 catalytic partner and other MT-interacting proteins (Hu *et al.*, 2014; Mishra-Gorur *et al.*, 2014).

Materials and Methods

Zebrafish maintenance

Zebrafish embryos (*Danio rerio*) were obtained from natural spawning of wild-type or transgenic Tg(*Hb9*:GFP) (Flanagan-Steet *et al.*, 2005), Tg(*Hb9*:Gal4) (Zelenchuk and Brusés, 2011), and the newly generated Tg(*UAS*:Spastin-HA) lines. All embryos were maintained at 28°C in E3 medium (5 mM NaCl, 0.17 mM KCl, 0.33 mM CaCl₂, 0.33 mM MgSO₄, 0.00001% (w/v) Methylene Blue) and staged by hours post-fertilisation (hpf) and gross morphology according to Kimmel *et al.* (1995). To prevent pigment formation, 0.2 mM of 1-phenyl-2-thiourea (PTU, Sigma) was added to the E3 media after the prim-5 stage.

Whole mount *In situ* hybridization

A 3' fragment of *p60-Katanin* (*katna1*) cDNA was isolated from a collection of 24-hpf zebrafish embryo mRNAs using the SuperScript® III One-Step RT-PCR system (Invitrogen) with the following forward and reverse primers: 5'-AGAGTGGATTTACTCAAGATCAACC-3' and 5'-AAGCTTGACTTGTACGCAGTGAACC-3'. The RT-PCR product was cloned into the TOPO® TA cloning pcr4 vector (Invitrogen) and sequenced. The *p60-Katanin* (*katna1*) digoxigenin-labeled sense and antisense riboprobes were synthesized from the linearised recombinant TOPO® TA cloning vector using

T7 and T3 RNA Polymerase (Promega) according to the supplier's instructions. Whole-mount *in situ* hybridisation experiments were performed at 18 and 24 hpf using standard procedures (Macdonald *et al.*, 1994). Pictures were acquired with a Leica M165C binocular stereomicroscope combined with a camera.

Morpholinos and RNA injections

Morpholino oligonucleotides (MO) blocking *p60-Katanin*, *tll6* or *tll11* translation initiation sites as well as the standard control MO were developed by GeneTools (Philomath, USA) and designed as follows :

- MO^{Ctl}: 5'-CCTCTTACCTCAGTTACAATTTATA-3',
- MO^{p60Kat}: 5'-CTCATTGATCTCCCCAAACTCATC-3',
- MO^{katnalaug1}: 5'-CATCCTGTAAGTTAAAGTGGTCAGT-3' (Butler *et al.*, 2010) ,
- MO^{TTLL6} : 5'-CTGGTGTCCCATTCTGATCTCTTC-3' (Pathak *et al.*, 2011) and
- MO^{TTLL11} : 5'-CGGCTGATTTGTTATCTCATCTAGG-3'.

MO^{p60Kat} was injected at 1.3 and 3.4 pmol/embryo, MO^{katnalaug1} at 0.9 pmol/embryo, MO^{TTLL6} at 0.2 pmol/embryo and MO^{TTLL11} at 0.8 pmol/embryo, while MO^{Ctl} was injected at all these doses depending on the controlled knockdown experiment. All morpholinos were injected at two-cell stage. Human full-coding *KATNA1* cDNA was isolated from a human fetal brain Marathon-ready cDNA collection (Clontech, Invitrogen) with the following forward and reverse primers: 5'-ATATAGGATCCATGTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTAGTCTTCTTATGATTAGTGAG-3' and 5'-ATATATCTAGATTAGCATGATCCAAACTCAAATATC-3', and subsequently cloned into pCS2+ BamH1/XbaI restriction sites for rescue experiments. Zebrafish *spastin* full-length cDNA was amplified and HA-tagged by PCR from the IMAGE clone BG728071 with 5'-ATACTCGAGCAAGCTTGATTTAGGTGA-3' forward and 5'-GGCTCTAGATCAAGCGTAGTCAGGCACGTCGTAAGGGTAACTAGCGCCTACGCCAGTCGTGTCTCCGT-3' reverse primers, and cloned into pCS2+ using the XhoI and XbaI restriction sites contained in the primers. Human *KATNA1*, mouse *TTLL6* and *TTLL11* (cDNAs provided by C Janke), as well as zebrafish *spastin* mRNAs were *in vitro*

transcribed from the corresponding linearized pCS2+ constructs using SP6 mMessage mMachine kit (Ambion) and injected at one-cell stage. For rescue or overexpression experiments, *KATNA1* mRNA was injected at 120 or 180 pg/embryo, *spastin* transcript at 150 pg/embryo, and both *TLL6* and *TLL11* at 120 pg/embryo.

Touch-escape response test and manual tracking

To assess the motor behaviour of control, morphant and rescued 72-hpf larvae, we performed a touch response test by applying a tactile stimulus with a pair of forceps and analysing their escape behaviour under a Leica M165 C binocular stereomicroscope equipped with a Leica IC80 HD camera. Swimming speed and distance of each larva were quantified using the Manual Tracking plugin included in the Fiji software as reported in Fassier *et al.* (2010). Statistical significance was evaluated using an unpaired t Student test in the StatView software. Three independent experiments showed the same statistical differences between control and morphant larvae.

Whole-mount immunohistochemistry

Zebrafish embryos were fixed in PBS-4% Paraformaldehyde during 2 hours at room-temperature, washed 3 times with PBT1% (PBS/1% Triton X-100) and permeabilised using a 0.25% trypsin solution (Gibco) at 25°C when embryos were older than 24 hpf. Embryos were then blocked for two hours in PBT1% supplemented with 10% of normal goat serum and incubated with primary antibodies overnight at 4°C PBT1% / 1% normal goat serum. The following primary antibodies were used: Znp-1 (1/100; ZIRC, University of Oregon), Zn-5 (1/200; ZIRC, University of Oregon) and GFP (1/1000; Molecular Probes). After several washes in PBT1%, embryos were incubated overnight at 4°C with the appropriate secondary antibody (Alexa Fluor 488 or 555 at 1/1000, Molecular Probes).

For polyglutamylated tubulin staining, embryos were fixed in Dent's fixative (80% Methanol / 20% DMSO) overnight at 4°C. After rehydration in regressive methanol/ PBS-0.5% Tween 20®), embryos were blocked in PBT1% supplemented with 1% DMSO, 1% bovine serum albumin and 5% normal goat serum, and sequentially incubated with primary antibodies, GT335 (1:1000, adipogen) and PolyE (1:1200; provided by C. Janke), and adequate secondary antibodies. Images were acquired using a fluorescence microscope equipped with an Apotome module (Zeiss, Axiovert 200M) and processed with the NIH Fiji software. Each figure corresponds to a projection image from a z-stack of 2 μm sections. Each experiment has been reproduced twice to three times independently and 10 control and morphant embryos were analysed in each of them.

Time-lapse videomicroscopy assay

Control and $\text{MO}^{\text{p60Kat}}$ -injected $\text{Tg}(\text{Hb9}:\text{GFP})$ embryos were anesthetized with E3 medium containing tricaine and embedded in 0,8% low melting agarose in a 35-mm glass dish (Iwaki). Time-lapse videomicroscopy recording of spinal motor axon outgrowth was carried out using a Leica DMI 6000B inverted spinning-disk microscope. Embryos immobilized at 22 hpf were filmed with a 20x immersion objective over a period of 48 hours, whereas embryos immobilized at 40 hpf were monitored with a 40x immersion objective over a period of 30 hours. In both cases, 1- μm z-stacks were taken every 8 minutes and compiled into time-lapse movies.

Generation of transgenic $\text{Tg}(\text{UAS}:\text{Spastin-HA})$ zebrafish

The DNA construct used for the creation of the transgenic $\text{Tg}(\text{UAS}:\text{Spastin-HA})$ line was generated by assembling the three elements below in the following order: (i) a SacII-SwaI fragment of plasmid 'T2 US E1B Cit UAS E1B MCS ACR' (kind gift from Sebastian Gerety and David Wilkinson) composed of an 'alpha-crystallin:mRFP' cassette, used for screening purposes due to its specific expression in the lens, (ii) a SwaI-AvrII fragment from a UAS expression vector (Baraban *et al.*, 2013) allowing specific expression of the transgene in GAL4-expressing cells, and (iii) an SpeI-NotI fragment containing the full-length HA-tagged *Spastin* cDNA followed by the SV40 3'UTR and

polyadenylation signal of the pCS2+ vector. The resulting construct was cloned into pBluescrit SKI-SceI (Grabher *et al.*, 2004), which was injected at 30pg/egg into freshly fertilised eggs together with I-SceI endonuclease (Roche) and 0.5% phenol red in 1X I-SceI digestion buffer (New England Biolabs). Injected fish were raised to adulthood and screened for germline transmission by detecting red fluorescence in the lens of their progeny at 72 hpf. The transgenic Tg(*UAS:Spastin-HA*) line was established from these positive carriers.

Acknowledgments

We thank Sebastian Gerety and David Wilkinson for the ‘alpha-crystallin:mRFP’ plasmid for screening our transgenic line, Susanne Bolte and Richard Schwartzmann from the imaging facility of the “Institut Biologie Paris Seine” (IBPS / UPMC, University Paris 6), Alex Bois and Stéphane Tronche for fish care, as well as Amélie Fréal and Filippo Del Bene for fruitful comments. DTM was a recipient of a PhD fellowship from the “Ministère de l’Education Nationale, de la Recherche et de la Technologie”. This work was supported by research grants to JH from the Association Française contre les Myopathies (AFM), the Emergence Programme from the UPMC (University Paris 6) and the Association Strümpell-Lorrain (ASL). CJ was supported by the ANR grant ANR-12-BSV2-0007.

Author Contribution

JH and CF designed the project and interpreted the data with DTM. DTM performed the functional characterisation of p60-Katanin, TTLL6 and TTLL11 during zebrafish motor neuron development with the exception of live video-microscopy carried out by CF. NJ analysed the differential role of Spastin and p60-Katanin in spinal motor axon outgrowth using the transgenic Tg(*UAS:Spastin-HA*) line created by CF and FG. LG provided technical assistance with the cloning and generation of various constructs. CJ performed cloning and had insightful comments for the realisation of the study. JH wrote the manuscript with the editing of CF, CJ and FG.

Conflict of Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Ahmad FJ, Yu W, McNally FJ, Baas PW (1999) An essential role for katanin in severing microtubules in the neuron. *J Cell Biol* **145**: 305-315
- Baraban M, Anselme I, Schneider-Maunoury S, Giudicelli F (2013) Zebrafish embryonic neurons transport messenger RNA to axons and growth cones in vivo. *J Neurosci* **33**: 15726-15734.
- Boucher D, Larcher JC, Gros F, Denoulet P (1994) Polyglutamylation of tubulin as a progressive regulator of in vitro interactions between the microtubule-associated protein Tau and tubulin. *Biochemistry* **33**: 12471-12477
- Brustein E, Saint-Amant L, Buss RR, Chong M, McDearmid JR, Drapeau P (2003) Steps during the development of the zebrafish locomotor network. *J Physiol Paris* **97**: 77-86
- Buck KB, Zheng JQ (2002) Growth cone turning induced by direct local modification of microtubule dynamics. *J Neurosci* **22**: 9358-9367
- Butler R, Wood JD, Landers JA, Cunliffe VT (2010) Genetic and chemical modulation of spastin-dependent axon outgrowth in zebrafish embryos indicates a role for impaired microtubule dynamics in hereditary spastic paraplegia. *Dis Model Mech* **3**: 743-751
- Conde C, Caceres A (2009) Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites. *Nat Rev Neurosci* **10**: 319-332
- Del Rio JA, González-Billault C, Ureña JM, Jiménez EM, Barallobre MJ, Pascual M, Pujadas L, Simó S, La Torre A, Wandosell F, Avila J, Soriano E (2004) MAP1B is required for Netrin 1 signaling in neuronal migration and axonal guidance. *Curr Biol* **14**: 840-850
- Dent EW, Barnes AM, Tang F, Kalil K (2004) Netrin-1 and semaphorin 3A promote or inhibit cortical axon branching, respectively, by reorganization of the cytoskeleton. *J Neurosci* **24**: 3002-3012
- Dent EW, Gupton SL, Gertler FB (2011) The growth cone cytoskeleton in axon outgrowth and guidance. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**: a001800
- Diaz-Valencia JD, Morelli MM, Bailey M, Zhang D, Sharp DJ, Ross JL (2011) Drosophila katanin-60 depolymerizes and severs at microtubule defects. *Biophys J* **100**, 2440-2449

Eom TY, Stanco A, Guo J, Wilkins G, Deslauriers D, Yan J, Monckton C, Blair J, Oon E, Perez A, Salas E, Oh A, Ghukasyan V, Snider WD, Rubenstein JL, Anton ES (2014) Differential regulation of microtubule severing by APC underlies distinct patterns of projection neuron and interneuron migration. *Dev Cell* **31**, 677-689

Erck C, Peris L, Andrieux A, Meissirel C, Gruber AD, Vernet M, Schweitzer A, Saoudi Y, Pointu H, Bosc C, Salin PA, Job D, Wehland J (2005) A vital role of tubulin-tyrosine-ligase for neuronal organization. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 7853-7858

Errico A, Claudiani P, D'Addio M, Rugarli EI (2004) Spastin interacts with the centrosomal protein NA14, and is enriched in the spindle pole, the midbody and the distal axon. *Hum Mol Genet* **13**:2121-2132

Fassier C, Hutt JA, Scholpp S, Lumsden A, Giros B, Nothias F, Schneider-Maunoury S, Houart C, Hazan J (2010) Zebrafish atlastin controls motility and spinal motor axon architecture via inhibition of the BMP pathway. *Nat Neurosci* **13**: 1380-1387

Flanagan-Steet H, Fox MA, Meyer D, Sanes JR (2005) Neuromuscular synapses can form in vivo by incorporation of initially aneural postsynaptic specializations. *Development* **132**: 4471-4481

Grabher C, Joly J-S, Wittbrodt J (2004) Highly efficient zebrafish transgenesis mediated by the meganuclease I-SceI. *Methods Cell Biol* **77**: 381-401.

Hartman JJ, Mahr J, McNally K, Okawa K, Iwamatsu A, Thomas S, Cheesman S, Heuser J, Vale RD, McNally FJ (1998) Katanin, a microtubule-severing protein, is a novel AAA ATPase that targets to the centrosome using a WD40-containing subunit. *Cell* **93**: 277-287

Hoogenraad CC, Bradke F (2009) Control of neuronal polarity and plasticity - a renaissance for microtubules? *Trends Cell Biol* **19**: 669-676

Hu WF, Pomp O, Ben-Omran T, Kodani A, Henke K, Mochida GH, Yu TW, Woodworth MB, Bonnard C, Raj GS, Tan TT, Hamamy H, Masri A, Shboul M, Al Saffar M, Partlow JN, Al-Dosari M, Alazami A, Alowain M, Alkuraya FS, Reiter JF, Harris MP, Reversade B, Walsh CA (2014) Katanin p80 regulates human cortical development by limiting centriole and cilia number. *Neuron* **84**: 1240-1257

Janke C, Rogowski K, van Dijk J (2008) Polyglutamylation: a fine regulator of protein function? 'Protein modifications: beyond the usual suspects review series'. *EMBO Rep* **9**: 636-641
Janke C, Kneussel M (2010) Tubulin post-translational modifications: encoding functions on the neuronal microtubule cytoskeleton. *Trends Neurosci* **33**: 362-372

Janke C (2014) The tubulin code: molecular components, readout mechanisms, and functions. *J Cell Biol* **206**: 461-472

Karabay A, Yu W, Solowska JM, Baird DH, Baas PW (2004) Axonal growth is sensitive to the levels of katanin, a protein that severs microtubules. *J Neurosci* **24**: 5778-5788

Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF (1995) Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn* **203**: 253-310

- Kolodkin AL, Tessier-Lavigne M (2011) Mechanisms and molecules of neuronal wiring: a primer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**: a001727.
- Lacroix B, van Dijk J, Gold ND, Guizetti J, Aldrian-Herrada G, Rogowski K, Gerlich DW, Janke C (2010) Tubulin polyglutamylase stimulates spastin-mediated microtubule severing. *J Cell Biol* **189**: 945-954
- Lee H, Engel U, Rusch J, Scherrer S, Sheard K, Van Vactor D (2004) The microtubule plus end tracking protein Orbit/MAST/CLASP acts downstream of the tyrosine kinase Abl in mediating axon guidance. *Neuron* **42**: 913-926
- Lewcock JW, Genoud N, Lettieri K, Pfaff SL (2007) The ubiquitin ligase Phr1 regulates axon outgrowth through modulation of microtubule dynamics. *Neuron* **56**: 604-620
- Lowery LA, Van Vactor D (2009) The trip of the tip: understanding the growth cone machinery. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**: 332-343
- Macdonald R, Xu Q, Barth KA, Mikkola I, Holder N, Fjose A, Krauss S, Wilson SW (1994) Regulatory gene expression boundaries demarcate sites of neuronal differentiation in the embryonic zebrafish forebrain. *Neuron* **13**: 1039-1053
- Mao CX, Xiong Y, Xiong Z, Wang Q, Zhang YQ, Jin S (2014) Microtubule-severing protein Katanin regulates neuromuscular junction development and dendritic elaboration in *Drosophila*. *Development* **141**: 1064-1074
- Marcos S, Moreau J, Backer S, Job D, Andrieux A, Bloch-Gallego E (2009) Tubulin tyrosination is required for the proper organization and pathfinding of the growth cone. *PLoS One* **4**: e5405
- Mishra-Gorur K, Çağlayan AO, Schaffer AE, Chabu C, Henegariu O, Vonhoff F, Akgümüş GT, Nishimura S, Han W, Tu S, Baran B, Gümüş H, Dilber C, Zaki MS, Hossni HA, Rivière JB, Kayserili H, Spencer EG, Rosti RÖ, Schroth J, Per H, Çağlar C, Çağlar Ç, Dölen D, Baranoski JF, Kumandaş S, Minja FJ, Erson-Omay EZ, Mane SM, Lifton RP, Xu T, Keshishian H, Dobyns WB, Chi NC, Šestan N, Louvi A, Bilgüvar K, Yasuno K, Gleeson JG, Günel M (2014) Mutations in KATNB1 cause complex cerebral malformations by disrupting asymmetrically dividing neural progenitors. *Neuron* **84**: 1226-1239
- Pathak N, Austin CA, Drummond IA (2011) Tubulin tyrosine ligase-like genes *tll3* and *tll6* maintain zebrafish cilia structure and motility. *J Biol Chem* **286**: 11685-11695
- Purro SA, Ciani L, Hoyos-Flight M, Stamatakou E, Siomou E, Salinas PC (2008) Wnt regulates axon behavior through changes in microtubule growth directionality: a new role for adenomatous polyposis coli. *J Neurosci* **28**: 8644-8654
- Qiang L, Yu W, Andreadis A, Luo M, Baas PW (2006) Tau protects microtubules in the axon from severing by katanin. *J Neurosci* **26**: 3120-3129
- Qiang L, Yu W, Liu M, Solowska JM, Baas PW (2010) Basic fibroblast growth factor elicits formation of interstitial axonal branches via enhanced severing of microtubules. *Mol Biol Cell* **21**: 334-344

Riano E, Martignoni M, Mancuso G, Cartelli D, Crippa F, Toldo I, Siciliano G, Di Bella D, Taroni F, Bassi MT, Cappelletti G, Rugarli EI (2009) Pleiotropic effect of spastin on neurite growth depending on expression levels. *J Neurochem* **108**: 1277-1288

Rothenberg ME, Rogers SL, Vale RD, Jan LY, Jan YN (2003) *Drosophila* pod-1 crosslinks both actin and microtubules and controls the targeting of axons. *Neuron* **39**: 779-791

Sharma N, Bryant J, Wloga D, Donaldson R, Davis RC, Jerka-Dziadosz M, Gaertig J (2007) Katanin regulates dynamics of microtubules and biogenesis of motile cilia. *J Cell Biol* **178**: 1065-1079.

Sharp DJ, Ross JL (2012) Microtubule-severing enzymes at the cutting edge. *J Cell Sci* **125**: 2561-2569

Sudo H, Baas PW (2010) Acetylation of microtubules influences their sensitivity to severing by katanin in neurons and fibroblasts. *J Neurosci* **30**: 7215-7226

van Dijk J, Rogowski K, Miro J, Lacroix B, Eddé B, Janke C (2007) A targeted multi-enzyme mechanism for selective microtubule polyglutamylation. *Mol Cell* **26**: 437-448

Valenstein ML, Roll-Mecak A (2016) Graded control of microtubule severing by tubulin glutamylation. *Cell* **164**, 911-921

Vitriol EA, Zheng JQ (2012) Growth cone travel in space and time: the cellular ensemble of cytoskeleton, adhesion, and membrane. *Neuron* **73**: 1068-1081

Wehenkel A, Janke C (2014) Towards elucidating the tubulin code. *Nat Cell Biol* **16**: 303-305

Wood JD, Landers JA, Bingley M, McDermott CJ, Thomas-McArthur V, Gleadall LJ, Shaw PJ, Cunliffe VT (2006) The microtubule-severing protein spastin is essential for axon outgrowth in the zebrafish embryo. *Hum Mol Genet* **15**: 2763-2771

Yu W, Qiang L, Solowska JM, Karabay A, Korulu S, Baas PW (2008) The microtubule-severing proteins spastin and katanin participate differently in the formation of axonal branches. *Mol Biol Cell* **19**: 1485-1498

Zelenchuk TA, Brusés JL (2011) In vivo labeling of zebrafish motor neurons using an mnx1 enhancer and Gal4/UAS. *Genesis* **49**: 546-554

Zhang D, Grode KD, Stewman SF, Diaz-Valencia JD, Liebling E, Rath U, Riera T, Currie JD, Buster DW, Asenjo AB, Sosa HJ, Ross JL, Ma A, Rogers SL, Sharp SJ (2011) *Drosophila* katanin is a microtubule depolymerase that regulates cortical-microtubule plus-end interactions and cell migration *Nat Cell Biol* **13**: 361-370

Figure legends

Figure 1. pMN axon outgrowth and branching are sensitive to p60-Katanin levels

A. Immunolabelling of pMN axons in 26-hpf embryos injected with a control morpholino (MO^{Ctl}; n=32), 1.3 or 3.4 pmol of *p60-Katanin* morpholino (MO^{p60Kat/1.3pmol}, n=32; MO^{p60Kat/3.4pmol}, n=32) or co-injected with the same two doses of *p60-Katanin* morpholino and 120 (for MO^{p60Kat/1.3pmol}) or 180 (for MO^{p60Kat/3.4pmol}) pg of KATNA1 transcript encoding human p60-katanin (MO^{p60Kat/1.3pmol} + mRNA^{KATNA1}, n=32; MO^{p60Kat/3.4pmol} + mRNA^{KATNA1}, n=32) using Znp-1 antibody. Lateral views of the trunk, anterior to the left. Arrows and asterisks indicate the hyperbranching or truncated phenotype of CaP axons observed in MO^{p60Kat/1.3pmol} and MO^{p60Kat/3.4pmol} embryos respectively. Scale bar: 50µm.

B. Mean number of branches. For panels B and C, quantifications were performed on 24 spinal cord hemisegments located around the yolk tube and statistically analysed using a Student's unpaired t test (**p≤0.01 ***p≤0.001). Error bars are SE.

C. Mean average percentage of truncated axons.

Figure 2. *p60-Katanin* knockdown markedly affects secondary motor axon targeting

A. Immunolabelling of sMN tracts in 72-hpf control (MO^{Ctl}; n=32), *p60-Katanin* morphants (MO^{p60Kat/1.3pmol}, n=32 and MO^{p60Kat/3.4pmol}, n=32) and rescued Tg(*Hb9*:GFP) transgenic larvae (MO^{p60Kat/1.3pmol} + mRNA^{KATNA1}, n=32; MO^{p60Kat/3.4pmol} + mRNA^{KATNA1}, n=32) with Zn-5 and GFP antibody. Lateral views of the trunk, anterior to the left. Right panels are higher magnification of left panels. Dotted lines mark the lateral myosepta. *p60-Katanin* knockdown specifically affects sMN axon targeting in a dose-dependent manner. MO^{p60Kat/1.3 pmol} larvae show abnormal dorsal tracts split in two (or three) dorsal fascicles (empty thick arrows) that aberrantly innervate the dorsal myoseptum, while many dorsal nerves fail to form in MO^{p60Kat/3.4 pmol} larvae compared to control and rescued larvae (full thin arrows). Moreover, the rostral projections appear misguided and abnormally grow caudally along the horizontal myoseptum in 26% of MO^{p60Kat/3.4pmol} or 9% of MO^{p60Kat/1.3pmol}

spinal hemisegments (empty arrowheads) compared to control or rescued hemisegments (full arrowheads). Finally, more than half of $\text{MO}^{\text{p60Kat}/3.4\text{pmol}}$ larvae exhibit aberrant ectopic sorting of sMN axons from the spinal cord (asterisk) which is barely observed in control and $\text{MO}^{\text{p60Kat}/1.3\text{pmol}}$ larvae, and partially rescued in doubly injected $\text{MO}^{\text{p60Kat}/3.4\text{pmol}} + \text{mRNA}^{\text{KATNA1}}$ larvae. Scale bar (Left panels): 25 μm . Scale bar (Right panels): 50 μm .

B-E. Quantifications of sMN axon defects caused by *p60-Katanin* knockdown. These quantifications were performed on 20 spinal hemisegments around the yolk tube and the difference between controls, morphants and rescued larvae were statistically analysed for each quantified parameter using a Student's unpaired t test (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$). Error bars are SE.

B. Average percentage of hemisegments with a misguided sMN dorsal projection.

C. Average percentage of hemisegments without sMN dorsal projection.

D. Average percentage of larvae with misguided rostral projection.

E. Average percentage of larvae with aberrant ectopic sorting of sMN axons from the spinal cord.

Figure 3. Loss of p60-Katanin function causes a dramatic decrease in zebrafish larval mobility

A. Motor behaviour tracking analysis of 72-hpf larvae injected with a control morpholino (MO^{Ct1} ; $n = 90$), $\text{MO}^{\text{p60Kat}/1.3\text{pmol}}$ ($n = 102$) and $\text{MO}^{\text{p60Kat}/3.4\text{pmol}}$ ($n = 85$), or co-injected with $\text{MO}^{\text{p60Kat}}$ and human *KATNA1* or zebrafish *spastin* mRNA ($\text{MO}^{\text{p60Kat}/1.3\text{pmol}} + \text{mRNA}^{\text{KATNA1}}$, $n = 91$; $\text{MO}^{\text{p60Kat}/1.3\text{pmol}} + \text{mRNA}^{\text{Spast}}$, $n = 87$; $\text{MO}^{\text{p60Kat}/3.4\text{pmol}} + \text{mRNA}^{\text{KATNA1}}$, $n = 97$) using a touch-response test. Each line represents the trajectory of one larva after touch stimulation. Scale bar: 5mm.

B. Quantification of the mean swimming distance.

C. Quantification of the mean swimming speed. The two sets of morphant larvae swim significantly slower and over shorter distances compared to control larvae. Co-injection of human *KATNA1* transcript, but not zebrafish *spastin* mRNA rescues the swimming deficits of *p60-Katanin* morphant larvae (** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$; Student's unpaired t test). Error bars are SE.

Figure 4. Ubiquitous or motoneuron-specific overexpression of Spastin fails to rescue spinal motor axon defects of *p60-katanin* morphants

A. Analysis of pMN and sMN axons in 26-hpf wild-type embryos (upper panels) and 72-hpf Tg(*Hb9*:GFP) larvae (middle and lower panels) injected with a control morpholino (MO^{Ctl}; n= 10), 1.3 pmol of *p60-katanin* morpholino (MO^{p60Kat} /1.3pmol, n= 10) or co-injected with 1.3 pmol of MO^{p60Kat} and human *spastin* mRNA (MO^{p60Kat} / 1.3 pmol + mRNA^{Spast}, n= 10). Immunolabelling of pMNs with Znp-1 antibody (upper panels) and sMNs with Zn-5 and GFP antibodies (middle and lower panels). Lateral views of the trunk, anterior to the left. Dotted lines indicate lateral myosepta. Co-injection of zebrafish *spastin* mRNA with MO^{p60Kat/1.3pmol} fails to rescue the branching defects of pMN CaP axons (arrowheads, upper panels), as well as the axon targeting errors of “MiP-like” sMN projections (empty thick arrows, middle panels) and “RoP-like” sMN tracts (empty arrowheads, bottom panels) of MO^{p60Kat/1.3pmol} embryos. In the middle and bottom panels, full thin arrows and full arrowheads indicate normal dorsal and rostral projections respectively. Scale bars : 25 μ m.

B. Average number of pMN branches.

C. Average percentage of hemisegments with split and misguided sMN dorsal tract.

D. Average percentage of hemisegments with misguided sMN rostral projection.

B-D. Quantifications were performed on 24 spinal hemisegments around the yolk tube in 26-hpf wild-type or 72-hpf Tg(*Hb9*:GFP) control, morphant and doubly injected (MO^{p60Kat/1.3pmol} + *spastin* mRNA) embryos and larvae.

E. Immunolabelling of pMNs in 26-hpf double transgenic Tg(*Hb9*:Gal4; *UAS*:Spastin-HA) embryos injected with a control morpholino or 1.3 pmol of *p60-katanin* morpholino using Znp-1 and anti-HA antibodies. Targeted overexpression of the MT-severing Spastin in spinal motor neurons equally fails to rescue the branching defects (red arrowheads) of MO^{p60Kat/1.3pmol} embryos (yellow arrowheads).

F. Quantification of the average number of branches per 100 Spastin-positive and -negative CaP motor neurons in 26-hpf Tg (*Hb9*:Gal4;*UAS*:Spastin-HA) control and MO^{p60Kat/1.3pmol} embryos. (B-D and F). Data were analysed using a Student's unpaired t test (***) $p \leq 0.001$; ns : non significant). Error bars are SE.

Figure 5. *TLL6* and *TLL11* knockdown differentially affects spinal motor axon outgrowth and targeting

A-B. Immunodetection of polyglutamylated MTs in 26- and 72-hpf wild-type embryos using GT335 (A) and poly E (B) antibodies that respectively label both short and long chains of glutamates or long chains only. Lateral views of the trunk, anterior to the left. Both populations of polyglutamylated MTs are observed in pMN (26 hpf) and sMN axons (72 hpf). Scale bars: 25 μm .

C. Overall morphology and spinal motor axon architecture of *TLL6* and *TLL11* morphants. Morphological analysis of 72-hpf control (MO^{Ctl}), *TLL6* (MO^{TLL6}) and *TLL11* (MO^{TLL11}) morphant larvae (upper panels). Both *TLL6* and *TLL11* morphants exhibit a severe ventrally curved body axis phenotype compared to MO^{Ctl} -injected larvae. Scale bars: 250 μm . Immunolabelling of pMNs using Znp-1 antibody (middle panels) and sMNs using Zn-5 and GFP antibodies (lower panels) in 26-hpf wild-type embryos or 72-hpf Tg(*Hb9*:GFP) larvae injected with MO^{Ctl} (n= 30 at both 26 hpf and 72 hpf), MO^{TLL6} (n= 30 at both 26 hpf and 72 hpf) or MO^{TLL11} (n= 30 at both 26 hpf and 72 hpf). Lateral views of the trunk, anterior to the left. *TLL6* knockdown mainly affects pMN branching while *TLL11* knockdown mainly alters pMN axon extension (middle panels). Arrows point out the aberrant branches of MO^{TLL6} and MO^{TLL11} CaP axons while asterisks indicate MO^{TLL11} truncated CaP axons. In the bottom panels, bottom pictures are higher magnifications of upper pictures. Dotted lines indicate lateral myosepta. The pathfinding defects of MO^{TLL6} sMN tracts strikingly resemble those of $\text{MO}^{\text{p60Kat/1.3pmol}}$ sMN axons, including split and misguided sMN dorsal projections (empty thick arrows) and caudally oriented misguided sMN “rostral” tracts (empty arrowheads). MO^{TLL11} sMN axon defects are somehow different from those of MO^{TLL6} larvae, with the exception of caudally oriented “rostral” projections (empty arrowhead), and are characterized by the lack of 50% of dorsal tracts, the defasciculation of the vast majority of rostral nerves (bracket) and the occurrence of aberrant ectopic sorting of sMN axons from the spinal cord (asterisks). Normal dorsal and rostral projections are incated by full thin arrows and full arrowheads respectively. Scale bars: 25 μm . D. Mean number of branches.

E. Average percentage of truncated CaP axons.

F. Average percentage of hemisegments with split and misguided sMN dorsal tract.

- G. Average percentage of hemisegments with misguided “rostral” projection.
 - H. Average percentage of hemisegments without sMN dorsal projection.
 - I. Average percentage of hemisegments with defasciculated rostral projection.
 - J. Average percentage of larvae with ectopic sorting of sMN axons from the spinal cord.
- D-J. Quantifications were performed on 24 spinal hemisegments located around the yolk tube in (D-E) 26- or (F-J) 72-hpf control, MO^{TTLL6} and MO^{TTLL11} embryos and larvae. Data were statistically analysed using a Student’s unpaired t test (**p≤0.01 and ***p≤0.001). Error bars are SE.

Figure 6. TTLL6 and TTLL11 play a non-redundant role in spinal motor axon out-growth and navigation

A. Rescue and crossed-rescue analyses of *TTLL6* morphant phenotype by co-injection of mouse *TTLL6* or *TTLL11* transcripts. Overall morphology at 72 hpf (upper panels) and immunohistochemical analyses of pMN (middle panels, Znp-1 antibody) and sMN (lower panels, Zn-5 and GFP antibodies) axon development in 26-hpf wild-type and 72-hpf Tg(*Hb9*:GFP) embryos and larvae injected with control morpholino (MO^{Ctl}, n= 10) *TTLL6* morpholino (MO^{TTLL6}, n= 10), or co-injected with MO^{TTLL6} and mouse *TTLL6* or *TTLL11* mRNA (MO^{TTLL6}+mRNA^{TTLL6}, n= 10 and MO^{TTLL6}+mRNA^{TTLL11}, n= 10). Middle and bottom panels, lateral views of the trunk, anterior to the left. In the middle panels, arrows point out the additional aberrant branches, while they indicate the normal dorsal projections in the bottom panels. Dotted lines show the lateral myosepta, full arrowheads indicate the normal rostral tracts whereas empty thick arrows and empty arrowheads point out morphant misguided dorsal and rostral projections respectively (bottom panels). Scale bars: 250 μm (upper panels) and 25 μm (middle and bottom panels).

B. Reciprocal rescue and crossed-rescue analyses of *TTLL11* morphant phenotype by co-injection of mouse *TTLL11* or *TTLL6* transcripts. Overall morphology at 72 hpf (upper panels) and immunohistochemical analyses of pMN (middle panels, Znp-1 antibody) and sMN (lower panels, Zn-5 and GFP antibodies) axon development in 26-hpf wild-type and 72-hpf Tg(*Hb9*:GFP) embryos and larvae injected with control morpholino (MO^{Ctl}, n= 10) *TTLL11* morpholino (MO^{TTLL11}, n= 10), or co-injected with MO^{TTLL11} and mouse *TTLL11* or *TTLL6* mRNA (MO^{TTLL11}+mRNA^{TTLL11},

n= 10 and MO^{TLL11}+mRNA^{TLL6}, n= 10). Middle and bottom panels, lateral views of the trunk, anterior to the left. Arrows, full arrowheads, empty thick arrows and empty arrowheads indicate the same normal or altered projections as in A. Asterisks point out pMN truncated axons and sMN axon extopic sorting from the spinal cord in the middle and bottom panels respectively. Scale bars: 250 μ m (upper panels) and 25 μ m (middle and bottom panels).

C. Mean number of pMN branches.

D. Average percentage of truncated CaP axons.

E. Average percentage of hemisegments with split and misguided sMN dorsal projection.

F. Average percentage of hemisegments with caudally oriented misguided “rostral” tracts.

G. Average percentage of hemisegments without dorsal nerve.

H. Average percentage of hemisegments with defasciculated rostral tracts.

I. Average percentage of larvae with ectopic sorting of sMN axons from the spinal cord.

All quantifications were performed on 20 spinal hemisegments (per embryo) located around the yolk tube, in each set of (C-D) 26- or (E-I) 72-hpf embryos or larvae. Data were analysed using a Student’s unpaired t test (*p \leq 0.01; **p \leq 0.01; ***p \leq 0.001; ns: non-significant). Error bars are SE.

Figure 7. The control of motor axon targeting by p60-Katanin is selectively influenced by TLL6-mediated MT polyglutamylation

A. Motor behaviour tracking analysis of 72-hpf larvae injected with a control morpholino (MO^{Ctl}, n=30), 1,3 pmol of MO^{p60Kat} (MO^{p60Kat/1.3pmol}, n=30) or co-injected with 1,3 pmol of MO^{p60Kat} and mouse *TLL6* (MO^{p60Kat/1.3pmol}+mRNA^{TLL6}, n=30) or *TLL11* mRNAs (MO^{p60Kat/1.3pmol}+ mRNA^{TLL11}, n=30). Each line represents the trajectory of one larva after touch stimulation. Injection of *TLL6* transcript, but not that of *TLL11* mRNA, rescues the motility deficit of MO^{p60Kat/1.3pmol} larvae. Scale bar : 5mm.

B. Analysis of pMN axon architecture by immunostaining with Znp-1 antibody in 26-hpf embryos injected with control morpholino (MO^{Ctl}, n=20), 1,3 pmol of MO^{p60Kat} (MO^{p60Kat/1.3pmol}, n=20) or co-injected with MO^{p60Kat/1.3pmol} and mouse *TLL6* (MO^{p60Kat/1.3pmol}+mRNA^{TLL6}, n=20) or *TLL11* mRNA (MO^{p60Kat}+mRNA^{TLL11}, n=20). Lateral views of the trunk, anterior to the

left. Arrows indicate aberrant supernumerary branches of CaP axons. *TTLL6* but not *TTLL11* overexpression rescues the hyperbranching defects of $\text{MO}^{\text{p60Kat}}/1.3$ pmol CaP axons. Scale bar: 25 μm .

C. Immunolabelling of sMN axon tracts using Zn-5 and GFP antibodies in 72-hpf Tg(Hb9:GFP) larvae injected with a control morpholino (MO^{Ctl} , n=20), 1,3 pmol of $\text{MO}^{\text{p60Kat}}$ ($\text{MO}^{\text{p60Kat}/1.3\text{pmol}}$, n=20) or co-injected with $\text{MO}^{\text{p60Kat}/1.3\text{pmol}}$ and mouse *TTLL6* ($\text{MO}^{\text{p60Kat}/1.3\text{pmol}}+\text{mRNA}^{\text{TTLL6}}$, n=20) or *TTLL11* mRNA ($\text{MO}^{\text{p60Kat}}+\text{mRNA}^{\text{TTLL11}}$, n=20). Lateral views of the trunk, anterior to the left. Dotted lines represent lateral myosepta. Full thin arrows and full arrowheads point out normal dorsal and rostral sMN projections respectively, while empty thick arrows and empty arrowheads indicate split and misguided dorsal tracts and caudally oriented “rostral” projections respectively. *TTLL6* but not *TTLL11* significantly rescues the targeting errors of $\text{MO}^{\text{p60Kat}/1.3\text{pmol}}$ sMN axon tracts. Scale bar: 25 μm .

D. Average number of CaP axon branches.

E. Average percentage of hemisegments with split and misguided dorsal nerve.

F. Average percentage of hemisegments with caudally oriented misguided “rostral” projection.

All quantifications were carried out on 24 spinal cord hemisegments (per embryo) located around the yolk tube. Data were statistically compared using a Student’s unpaired t test (* $p \leq 0.01$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$; ns: non-significant). Error bars are SE.

Figures

Figure 1. pMN axon outgrowth and branching are sensitive to p60-Katanin levels

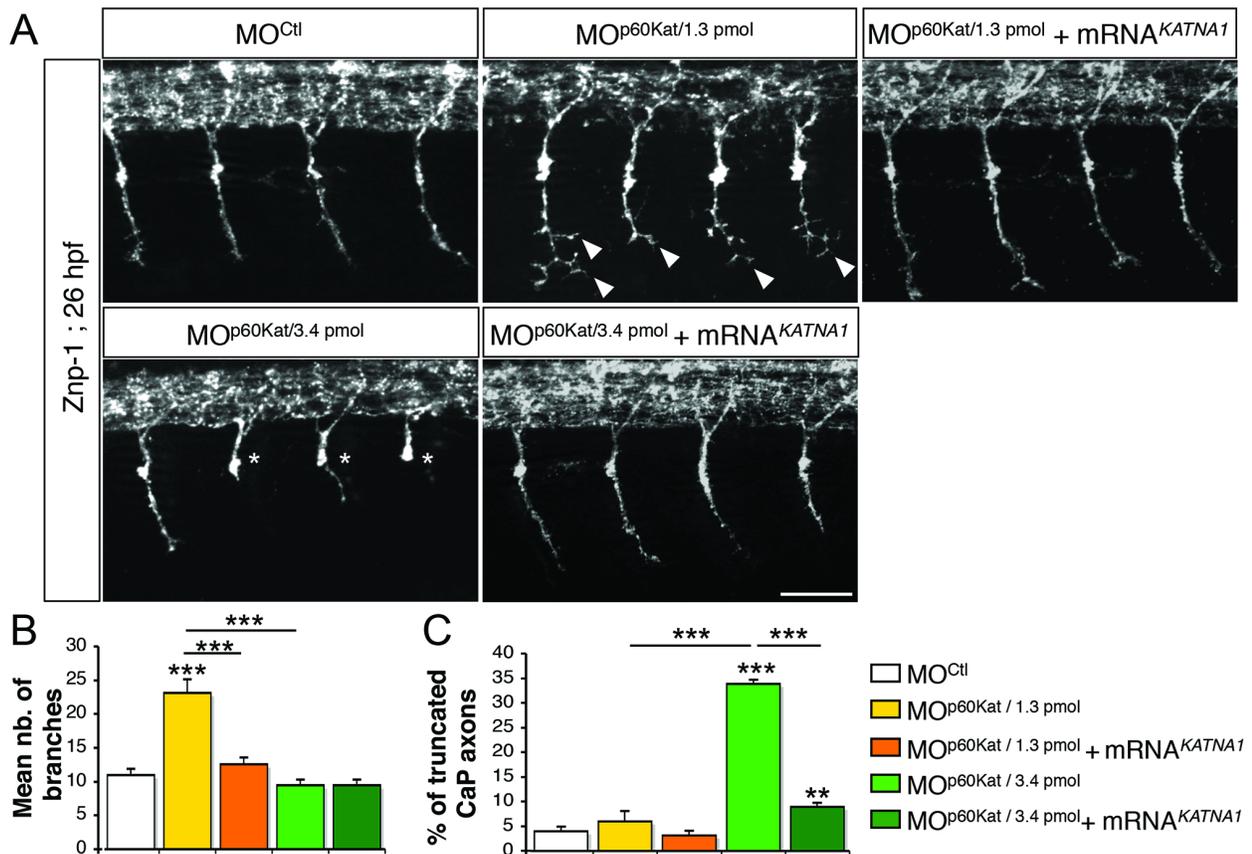


Figure 2. *p60-Katanin* knockdown markedly affects secondary motor axon targeting

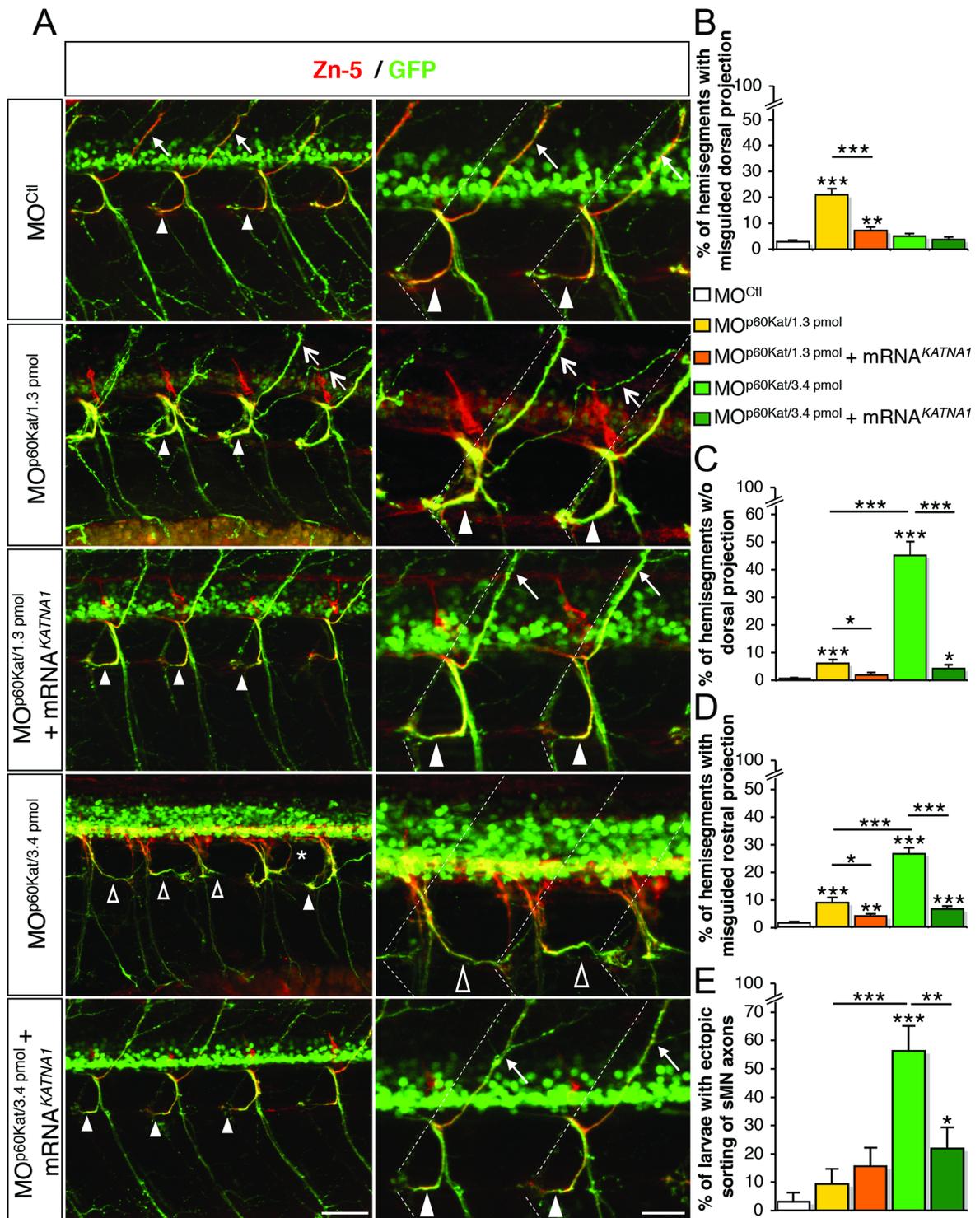


Figure 3. Loss of p60-Katanin function causes a dramatic decrease in zebrafish larval mobility

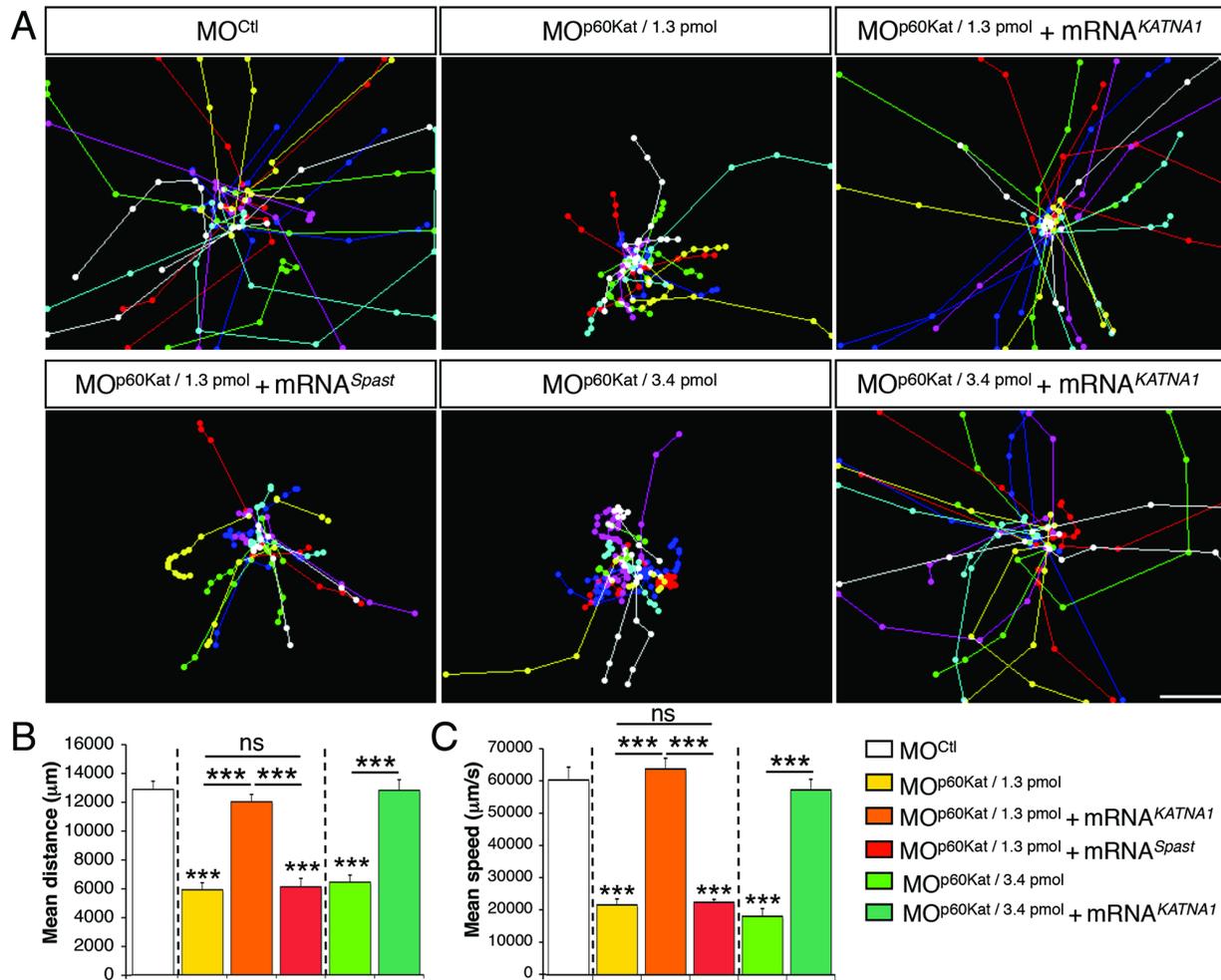


Figure 4. Ubiquitous or motoneuron-specific overexpression of Spastin fails to rescue spinal motor axon defects of *p60-katanin* morphants

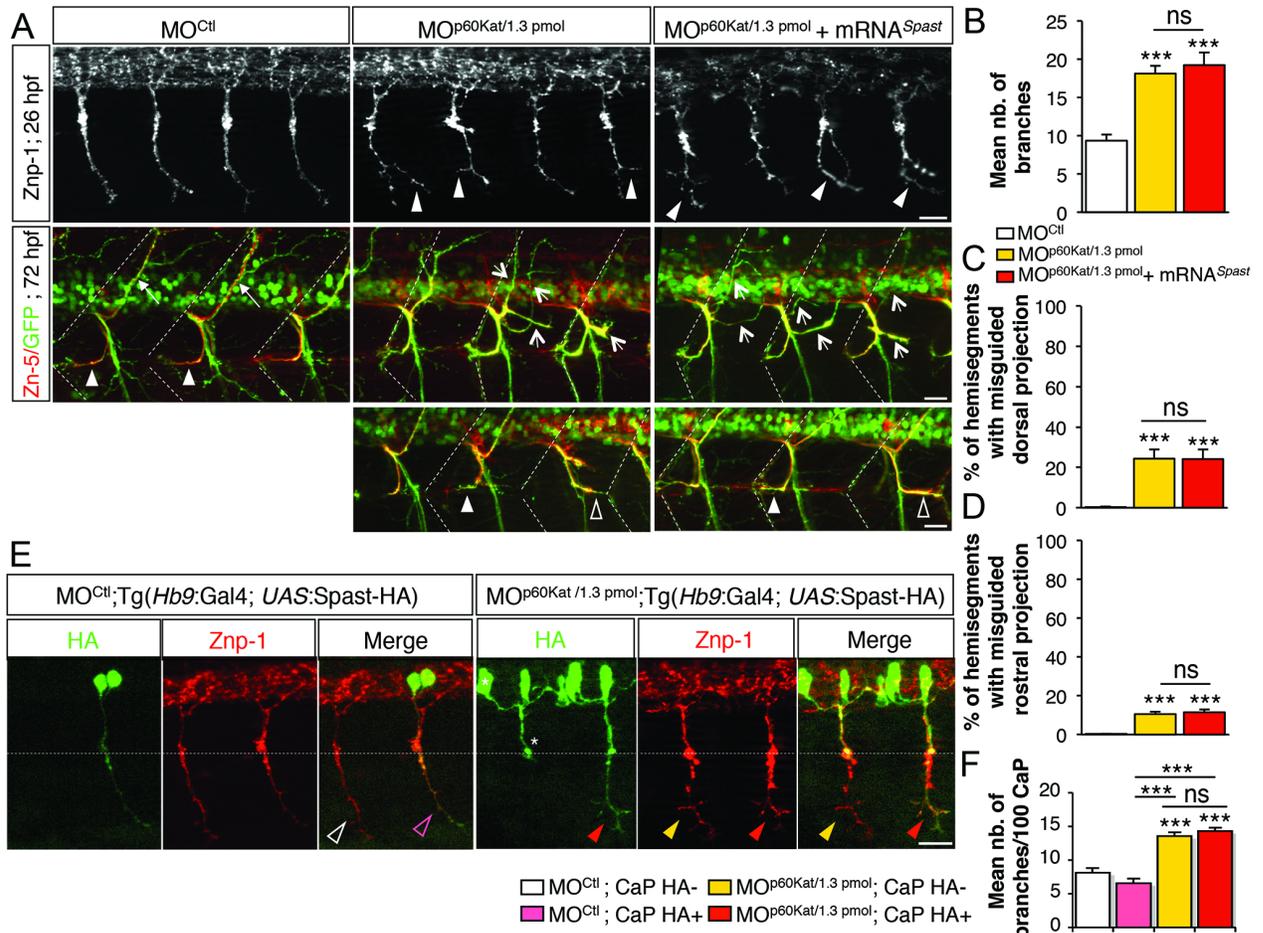


Figure 5. *TLL6* and *TLL11* knockdown differentially affects spinal motor axon outgrowth and targeting

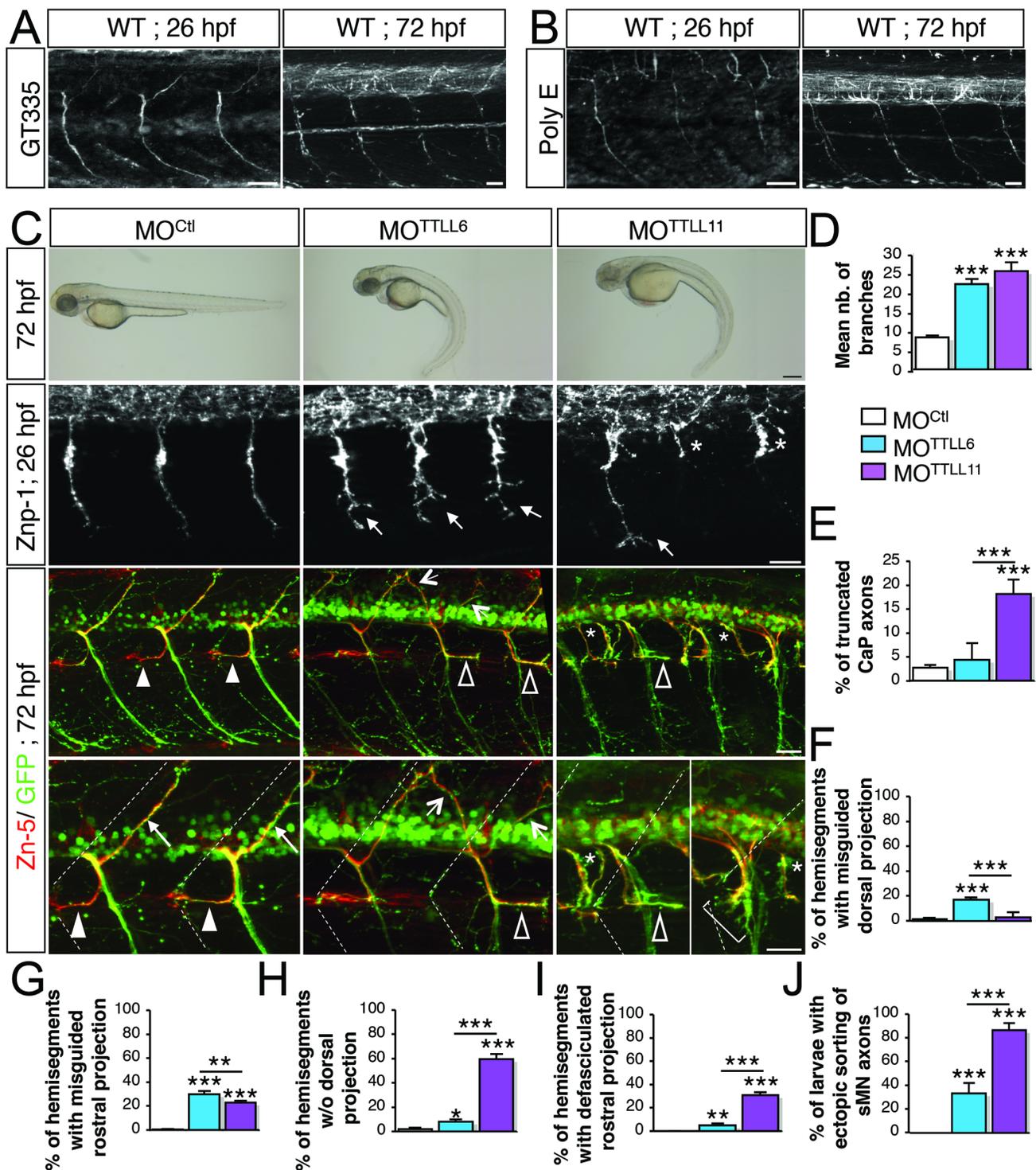


Figure 6. TLL6 and TLL11 play a non-redundant role in spinal motor axon out-growth and navigation

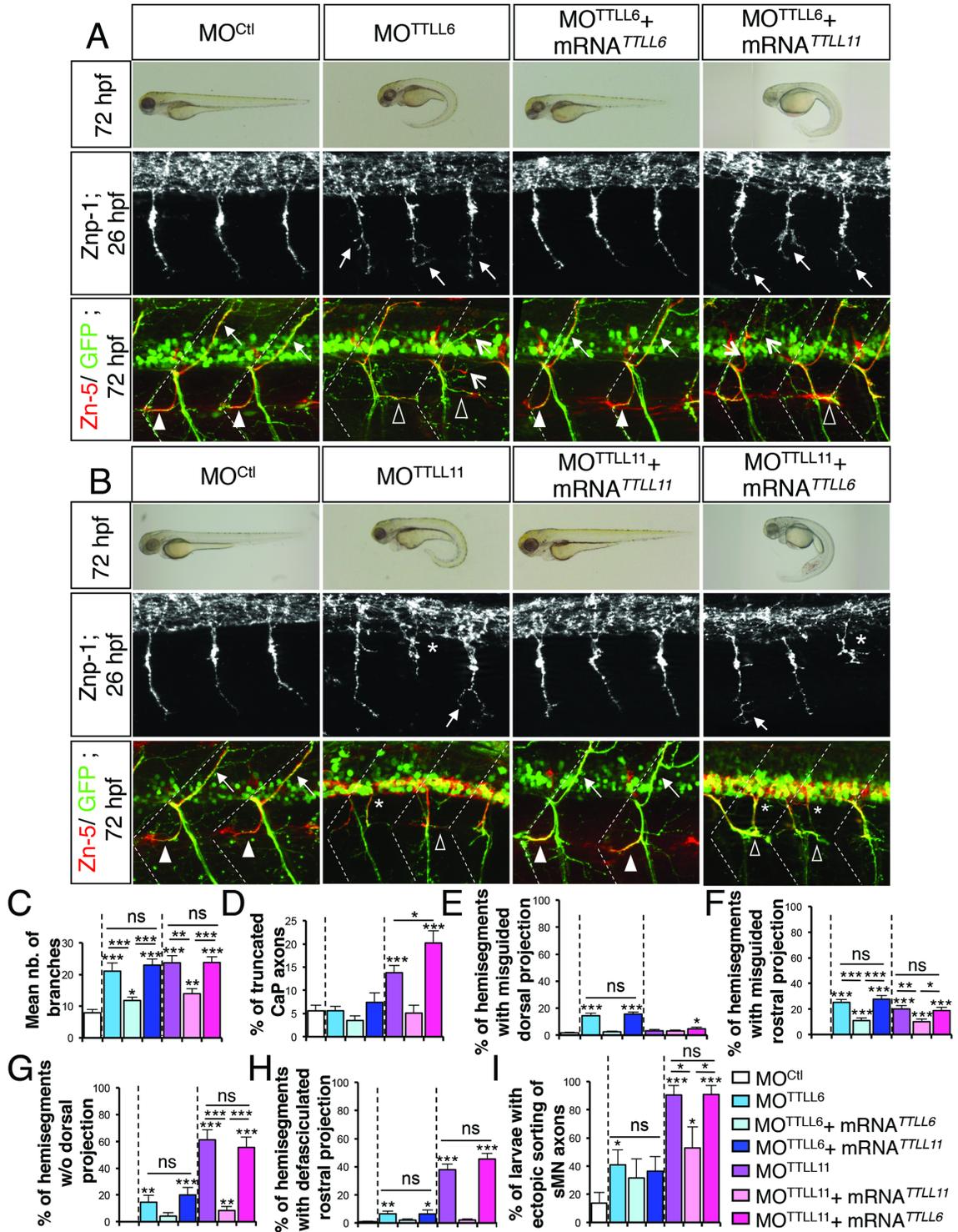
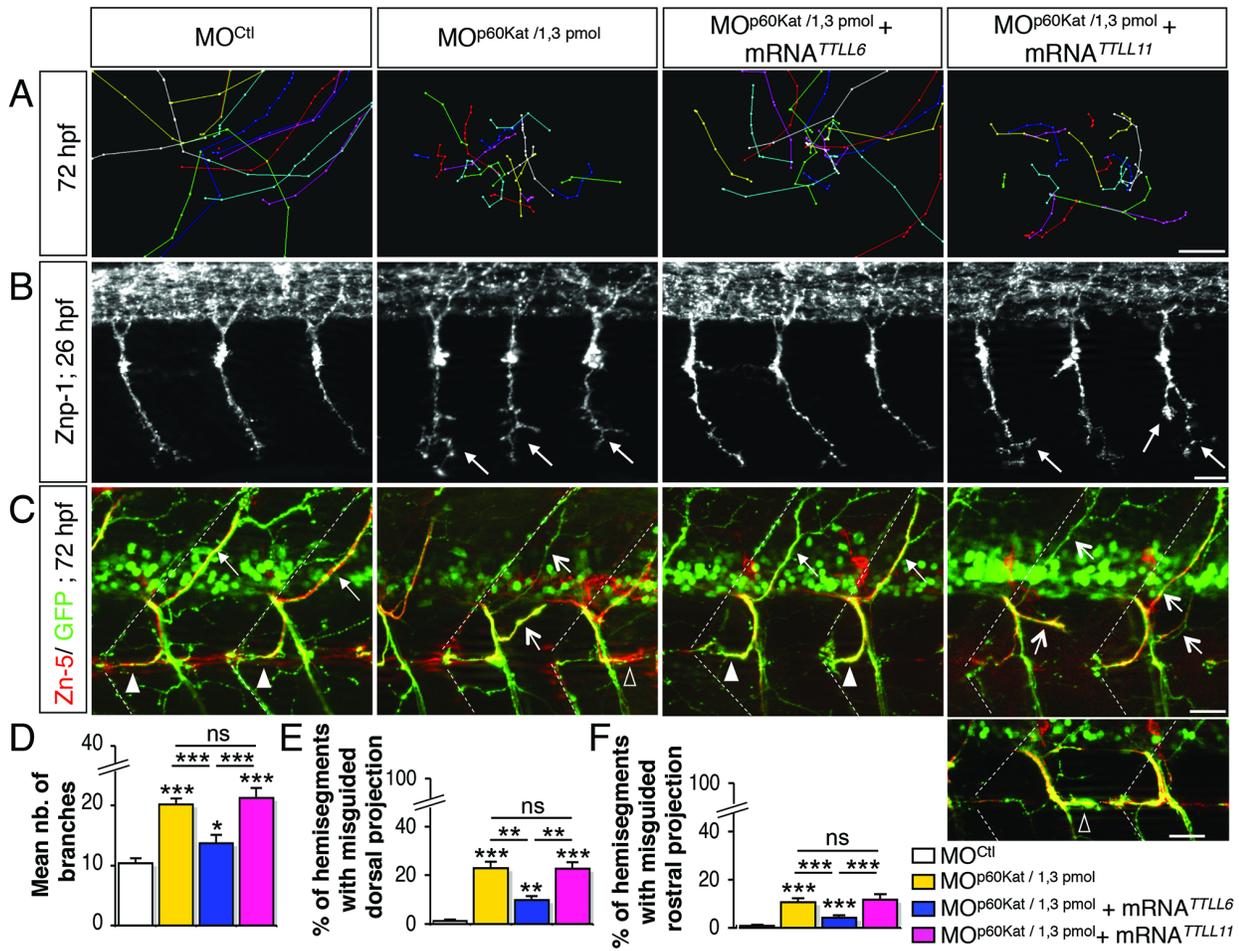


Figure 7. The control of motor axon targeting by p60-Katanin is selectively influenced by TLL6-mediated MT polyglutamylation



Supplementary Figures legends

Supplementary Figure S1. *p60-Katanin* transcript is enriched in the zebrafish developing nervous system

Whole-mount *in situ* hybridisation with *p60-Katanin* sense (upper panel) and antisense (bottom panel) riboprobes at 18 and 24 hours post fertilisation (hpf). Lateral views of the embryos, anterior to the left. *p60-Katanin* is highly enriched in the developing nervous system at both 18 and 24 hpf, two stages at which pMN and sMN axons exit the spinal cord to travel towards their muscle targets. Scale bars: 200 μm .

Supplementary Figure S2. *p60-Katanin* knockdown using a second morpholino, MO^{katna1aug1}, induces identical spinal motor axon defects in similar proportions

A. Immunolabelling of sMN tracts in 72-hours-post-fertilisation (hpf) transgenic Tg(*Hb9*:GFP) larvae injected with control (n=30) or MO^{katna1aug1} (n=30) morpholinos, using Zn-5 and GFP antibodies. Lateral views of the trunk, anterior to the left. Bottom panels represent higher magnifications of top panels. Dotted lines indicate lateral myosepta. In MO^{katna1aug1}-injected larvae, a few sMN rostral projections are misrouted caudally (empty arrowheads versus full arrowheads in controls) and dorsal nerves fail to form compared to control dorsal projections (arrows). We also observe occasional ectopic sorting of sMN axons from the spinal cord in morphant larvae (asterisk).

B. Average percentage of hemisegments with misguided rostral nerve.

C. Average percentage of hemisegments without dorsal nerve. Quantifications were performed on 24 spinal hemisegments located around the yolk tube. Data were statistically compared using a Student's unpaired t test (***) $p \leq 0.001$. Error bars are SE.

Supplementary Movies S1: *p60-katanin* knockdown seriously impairs spinal motor axon navigation

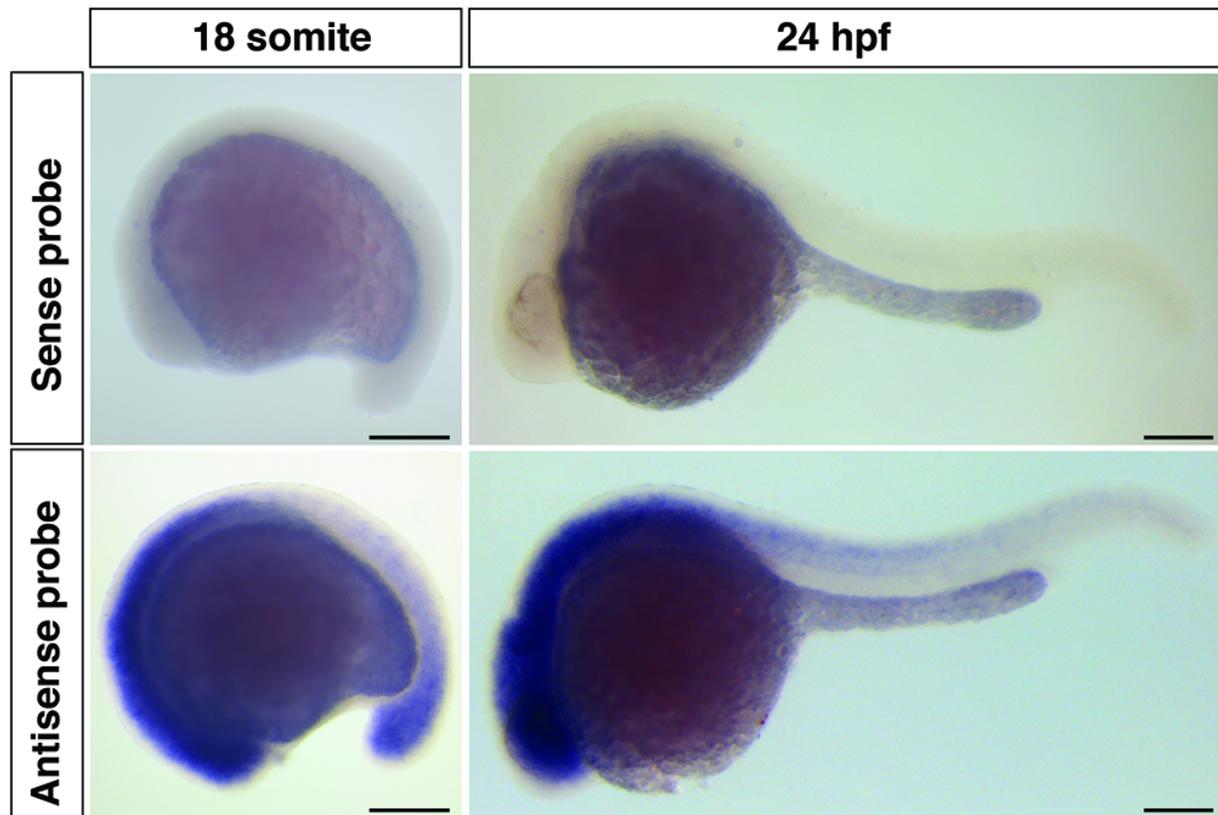
Time-lapse videomicroscopy on control (Movies S1A and S1C) and MO^{p60Kat} -injected (Movies S1B and S1D) Tg(*Hb9*:GFP) larvae from 20 to 72 hpf (Movies S1A and S1B) or from 42 to 72 hpf (Movies S1C and S1D).

Supplementary Movies S2: The swimming deficit of *p60-katanin* morphants is rescued by misexpression of human *KATNA1* transcript but not by zebrafish *Spastin* mRNA

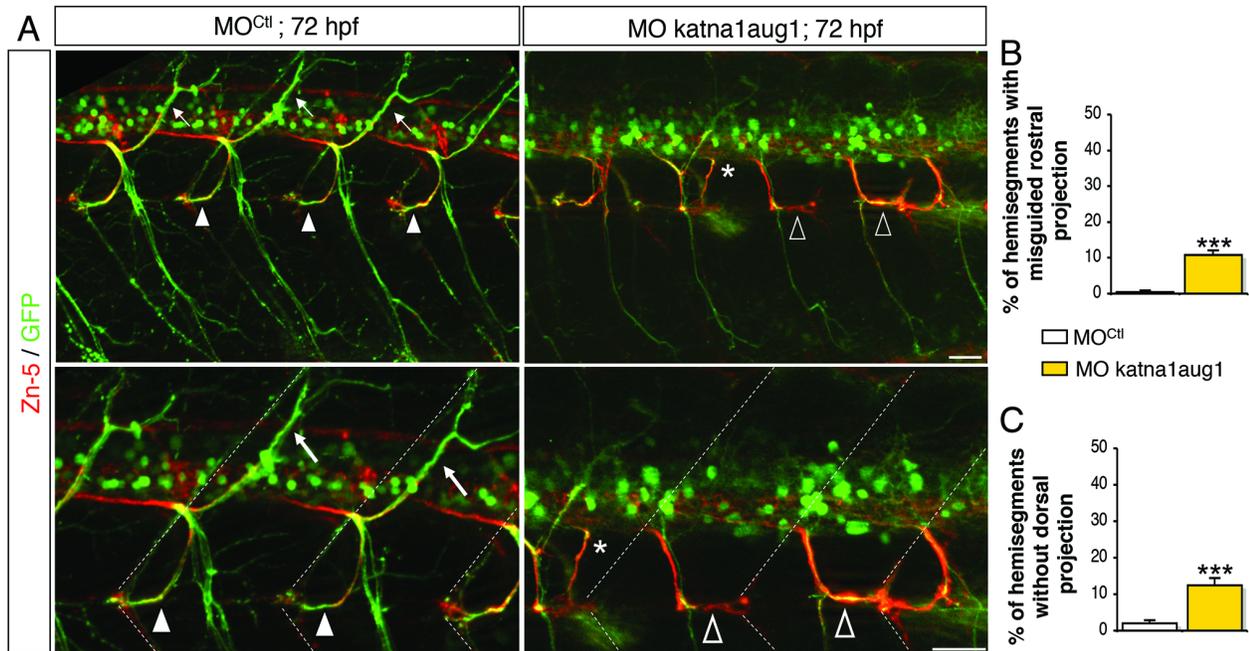
Touch-evoked mobility of 72-hpf control (Movie S2A), $MO^{p60Kat/1.3pmol}$ -injected (Movie S2B), doubly ($MO^{p60Kat/1.3pmol}$ + 120 pg of human *KATNA1* mRNA)-injected (Movie S2C), $MO^{p60Kat/3.4pmol}$ -injected (Movie S2D), doubly ($MO^{p60Kat/3.4pmol}$ + 180 pg of human *KATNA1* mRNA)-injected (Movie S2E) and ($MO^{p60Kat/1.3pmol}$ + 150 pg of zebrafish *spastin* mRNA)-injected (Movie S2F) larvae.

Supplementary Figures

Supplementary Figure S1. *p60-Katanin* transcript is enriched in the zebrafish developing nervous system



Supplementary Figure S2. *p60-Katanin* knockdown using a second morpholino, MO^{katna1aug1}, induces identical spinal motor axon defects in similar proportions



Dysregulation of key developmental signalling pathways in *SPG4*-linked spastic paraplegia

Nicolas Jardin¹, François Giudicelli², Daniel Ten Martín¹, Stéphanie De Gois¹, Rachel Allison³, Corinne Houart⁴, Evan Reid³, Jamilé Hazan^{1*} and Coralie Fassier^{1*}

1. Sorbonne Universités, UPMC Université Paris 06, INSERM, CNRS, Neuroscience Paris Seine - Institut de Biologie Paris-Seine (NPS-IBPS), 75005 Paris, France

2. Sorbonne Universités, UPMC Université Paris 06, CNRS, INSERM, Biologie du Développement Paris Seine - Institut de Biologie Paris-Seine (LBD-IBPS), 75005 Paris, France

3. Cambridge Institute for Medical Research, University of Cambridge, Cambridge CB2 0XY, UK

4. Medical Research Council Centre for Developmental Neurobiology, King's College London, London SE1 1UL, UK.

* Address correspondence to : Coralie Fassier, Sorbonne Universités, UPMC Université Paris 06, INSERM U1130, CNRS UMR 8246, Neuroscience Paris Seine - Institut de Biologie Paris-Seine (NPS-IBPS), 7 quai Saint Bernard, Bâtiment A 3ème étage, case courrier 02, Phone : 00.33.1.44.27.44.21; E-mail: coralie.fassier@upmc.fr.

Or to: Jamilé Hazan, Sorbonne Universités, UPMC Université Paris 06, INSERM U1130, CNRS UMR 8246, Neuroscience Paris Seine - Institut de Biologie Paris-Seine (NPS-IBPS), 7 quai Saint Bernard, Bâtiment A 3ème étage, case courrier 02, Phone : 00 33 1 44 27 32 72; E-mail: jamile.hazan@upmc.fr.

Abstract

Mutations in *SPG4*, encoding the microtubule-severing spastin, cause the major form of hereditary spastic paraplegia (HSP), a paralytic disorder characterised by degeneration of the cortico-spinal tracts. Spastin is involved in diverse cellular processes coupling microtubule severing to membrane remodelling such as endosomal tubulation, endoplasmic reticulum shaping and axonal transport homeostasis. Two main spastin isoforms are synthesized from alternative translational start sites (M1 and M87). However, their specific roles and respective contribution to HSP pathogenesis remain largely unknown. To selectively unravel their neuronal function, we blocked spastin synthesis from each initiation codon during development of the zebrafish and performed rescue analyses. The knockdown of each spastin isoform leads to different motor axon pathfinding and locomotor defects that could not be rescued by the selective expression of the other isoform. We further show the concerted role for M1 spastin and HSP-causing atlastin-1 and NIPA1 in the down-regulation of the BMP pathway and reveal a specific role for M87 spastin as a downstream effector of Neuropilin-1 signalling. Altogether, our study emphasizes defective BMP signalling as a key pathogenic mechanism in HSP, and show that dysregulation of the Neuropilin-1 pathway may equally contribute to *SPG4*-linked HSP.

Introduction

Alterations of the signalling pathways induced by Bone Morphogenetic Proteins (BMP) are associated with a broad spectrum of human disorders including cancers, inflammatory, vascular and skeletal diseases as well as neurodegenerative disorders (1-3). During the last decade, BMP signalling has been involved in multiple physiological and pathological conditions of the nervous system and has more specifically emerged as a critical pathway for motor circuit wiring and function (3-7). The BMP pathway was indeed shown to influence motor neuron development (3, 8-10) and degeneration in a few paralytic disorders including hereditary spastic paraplegia (HSP; 3, 7, 10-16) and axonal regeneration after spinal cord injury (17).

HSP is a heterogeneous group of neurodegenerative disorders mainly characterised by progressive spasticity and weakness of the lower limbs due to the degeneration of the cortico-spinal tracts. HSP shows an extreme genetic heterogeneity with more than 84 loci and 67 HSP genes identified so far (18). Among these numerous HSP-causing factors, a significant subgroup of Spastic Paraplegia Genes (SPG) encode proteins involved in endosomal trafficking (18-20). Furthermore, six of these proteins, encoded by *SPG3A*, *SPG4*, *SPG6*, *SPG20*, *SPG39* and *SPG42* down-regulate the BMP signalling pathway either *in vitro* (12) or *in vivo* (10-11, 13-16). Among these endocytic HSP proteins, the well-known microtubule-severing spastin, encoded by *SPG4* (21-23), is involved in the most frequent form of autosomal dominant HSP (AD-HSP) and altered in approximately 40% of AD-HSP cases (21, 24). More than 200 mutations have been described within *SPG4* and the vast majority of them are likely to act via haploinsufficiency (23-25). Spastin is essential for numerous cellular processes linking microtubule (MT) severing to membrane remodelling (26) such as endosomal tubule fission (27), the shaping of tubular endoplasmic reticulum (ER) (28), lipid droplet formation (29) as well as spindle disassembly, nuclear envelope sealing and midbody abscission during mitosis (30-31). In neurons, spastin was shown to be required for axon outgrowth and branching (25, 32-35) and for axonal maintenance and transport homeostasis (36-39). Importantly, mammalian *SPG4* transcript directs the synthesis of two main spastin isoforms through alternative translational start sites (the long M1 and short M87 isoforms; 40). These major isoforms show different structural domains (40), subcellular distribution (29, 31, 40) and binding partners (28, 41-43), suggesting their functional specificity. Besides, few arguments suggest a role for the M1 isoform in the BMP pathway. M1 specifically binds the GTPase atlastin-1 (41-42), which is responsible for the second major form of AD-HSP (44). Notably, zebrafish atlastin-1 controls spinal motor axon targeting and larval mobility by inhibiting the BMP pathway (10) while pathogenic mutations of this GTPase were shown to interfere with the trafficking of BMP type II receptor (BMPRII) in cortical neurons (45). Besides, atlastin-1 interacts with the HSP protein NIPA1 (46-47), which inhibits BMP signalling by targeting BMPRII to lysosomal degradation (11-12). Finally, BMP signalling is up-regulated in spastin-depleted HeLa cells (12).

Although spastin function has been actively investigated, most of its functional studies were performed *ex vivo* in non-neuronal cell lines and failed to specifically address the differential roles of spastin major isoforms *in vivo* in motor neurons or their respective contribution to *SPG4*-linked HSP pathogenesis. Using knockdown and rescue analyses during zebrafish embryogenesis, we here show that both spastin isoforms have critical and non-overlapping function in spinal motor neuron development and larval locomotion. Furthermore, our study reveals the specific involvement of M1 in the BMP pathway. Indeed, the lack of M1 leads to motor axon targeting defects that are strikingly similar to those observed in zebrafish *Atlastin-1*- and *NIPA1*-depleted larvae and that are partially rescued by genetic inhibition of the BMP pathway. Finally, we unexpectedly unveil a specific role for the M87 spastin isoform as a downstream effector of *Neuropilin-1a* signalling in motor neurons. Thus, our functional analysis of spastin main isoforms led us to hypothesise that defective *Neuropilin-1*-mediated signalling associated with M87 spastin deficiency could contribute to *SPG4*-linked HSP pathogenesis in addition to an abnormal upregulation of BMP signalling.

Results

Zebrafish *spastin* transcript drives the synthesis of two Spastin isoforms with distinct subcellular distribution in developing motor neurons

To date, *spastin* knockdown experiments in the zebrafish were performed with antisense morpholino oligonucleotides targeted against the first ATG (27, 34, 48) whereas the presence of a second in-frame ATG (encoding Methionine 61 and corresponding to human M87), had been detected in the teleost sequence (34; Figure 1, A). To assess whether alternative translation of zebrafish *spastin* transcript drives the synthesis of two main isoforms as in mammals, we cloned the HA-tagged version of zebrafish *spastin* cDNA with its 5'UTR (UnTranslated Region), known to influence the expression ratio of the two isoforms (40), in a pCS2+ vector (pCS2+DrSp-HA). We next performed targeted mutagenesis of each ATG (pCS2+DrSp-HAMut^{ATG1}; pCS2+DrSp-HAMut^{ATG2}; Figure 1, B) and analysed the expression of Spastin in a heterologous cell system. Western blot analysis

of total protein lysates from COS-7 cells transfected with these different constructs using an HA antibody revealed that these two ATG are functional and drive the synthesis of two Spastin isoforms (Figure 1, C): a long form of 62kDa (DrM1) and a short one of 55kDa (DrM61), which both showed microtubule-severing activity *in vitro* (Figure 1, D). As in mammals, the expression ratio of these two isoforms was strikingly conserved, with the long isoform showing a far weaker expression due to the presence of a poor but highly conserved Kozak consensus sequence surrounding the first ATG (Figure 1, A, C). Similar results were obtained *in vivo* in zebrafish embryos, following the injection of *spastin* mRNAs that were *in vitro* transcribed from wild type (*DrSpastin-HA*) and mutated pCS2+DrSp-HA constructs (*DrM61-HA* and *DrM1-HA*; Figure 1, E), indicating that the synthesis of zebrafish Spastin occurs through alternative usage of two initiation codons. Since spastin86-340 antibody, raised against human spastin (31), specifically recognized overexpressed DrM1 and DrM61 in COS-7 cells (Figure 1, C), this antibody allowed us to assess the endogenous expression of these two isoforms during zebrafish development. Protein extracts from tailbud embryos injected with *DrSpastin-HA* mRNA were used to unequivocally identify endogenous full-length DrM1 and DrM61. Both isoforms were expressed from early embryonic stages. Furthermore, an additional smaller band around 52kDa was also detected at all developmental stages (Figure 1, F) and most likely corresponds to a splice variant of the short isoform: indeed, we showed that (i) *spastin* exon 4 can be alternatively spliced at these embryonic stages, as previously described in nematodes and mammals (Figure 1, G; 49-50); (ii) this shorter variant was not detected in *DrSpastin-HA in vitro* transcription, but (iii) was equally immunolabelled by the S51 spastin antibody (data not shown; 51). This splice variant turned out to be the major short isoform from the 18-somites stage onwards (Figure 1, F). Moreover, the expression ratio between the long and the short isoforms significantly varied throughout the first days of development, and especially at key time points of spinal motor neuron development (between 18-somites and 32 hours post-fertilization, hpf). This ratio was mainly influenced by the striking variations in DrM1 expression and was highly reproducible, which suggested that tight regulation of the expression of both isoforms could be important for zebrafish motor circuit wiring (Figure 1, F). To investigate their subcellular distribution, we used the *UAS/GAL4* system, and generated two distinct transgenic lines expressing an HA-tagged version of DrM1 or DrM61 under the control

of a *UAS* promoter. By crossing these transgenic fish with the Tg(mnGFF7) fish (52-53), which selectively express the transactivator GAL4 in spinal motor neurons (SMN), we showed that both isoforms display distinct subcellular distribution in these neurons (Figure 1, H). DrM1 showed a punctate distribution within the soma as well as all along the axon shaft (arrows, Figure 1, H), and was strikingly enriched in the growth cone (arrowheads, Figure 1, H), while DrM61 was expressed in the whole neuron and mainly diffused in the cytoplasm, highlighting their suspected functional specificity.

The knockdown of each spastin isoform differentially affects zebrafish morphology and locomotor behaviour

To unravel the neuronal function of each Spastin isoform, we took advantages of the morpholino-based knockdown strategy, which has the unique capacity to block protein synthesis from initiation codons without triggering the degradation of the targeted transcript unlike RNA-interference approaches in mammals (54). Morpholinos targeting the first (MO_{sp}^{ATG1}) or the second ATG (MO_{sp}^{ATG2}) were designed and injected in 2-cell stage embryos to respectively down-regulate DrM1 or DrM61 during zebrafish development (Figure 2, A). Control mismatch ($COMO_{sp}^{ATG1}$ and $COMO_{sp}^{ATG2}$) and scramble morpholinos (MOscr) were used as controls (Supplementary Figure 1). The knockdown efficiency of each Spastin isoform was assessed by western blot analysis using protein extracts from tailbud embryos co-injected with MO_{sp}^{ATG1} , MO_{sp}^{ATG2} , or the corresponding mismatch morpholinos and *DrSpastin-HA* mRNA, using an antibody against the HA tag (Figure 2, B). MO_{sp}^{ATG2} specifically and efficiently decreased DrM61 expression by 61% compared to $COMO_{sp}^{ATG2}$, without affecting DrM1 levels (Figure 2, B-C). In contrast, as expected for a morpholino targeting a region located upstream both ATGs (54), MO_{sp}^{ATG1} significantly reduced DrM1 expression by 87% compared to $COMO_{sp}^{ATG1}$ but also affected DrM61 levels (41% decrease compared to $COMO_{sp}^{ATG1}$), although to a lesser extent than MO_{sp}^{ATG2} injection (Figure 2, B-C). Notably, both ATG1 and ATG2 morphants (i.e., embryos injected with MO_{sp}^{ATG1} or MO_{sp}^{ATG2} respectively) failed to hatch from their chorion at the onset of larval stages but the two classes of morphants exhibited strikingly different morphological and locomotor phenotypes (Figure 2, D-F). The vast majority of ATG1

morphants showed a curved-tail phenotype (arrow, Figure 2, D), while all ATG2 morphants displayed smaller eyes (asterisk, Figure 2, D) and a yolk tube agenesis (arrowhead; Figure 2, D) compared to *COMOsp^{ATG1}* and *COMOsp^{ATG2}* larvae, respectively. Furthermore, both morphants showed obvious locomotor deficits in the escape-touch response test at 72 hpf, which were characterized by reduced swimming speed and covered distances compared to their related control larvae, and appeared to be more severe for ATG2 than for ATG1 morphants (Figure 2, D-F and Supplementary Videos 1, A-D). In addition, ATG2 morphants showed atypical touch-evoked startle response compared to *MOsp^{ATG1}* and *COMOsp^{ATG2}* larvae. In the zebrafish, the larval startle response triggered by a tactile stimulus can be fragmented into a series of stereotypic movement patterns including a high-speed turn, called C-bend, which occurs milliseconds after the stimulus and is required for escape (55). ATG2 morphants were unable to initiate a rapid C-bend movement in response to tactile stimuli and reproducibly swam straight ahead over short distances compared to *MOsp^{ATG1}*, *COMOsp^{ATG1}* and *COMOsp^{ATG2}* larvae, which repeatedly exhibited a high C-bend maximal body curvature to escape in the opposite direction from the stimuli (arrowheads, Figure 2, G-H). These distinct locomotor behaviours of ATG1 and ATG2 morphants strongly suggested that the loss of DrM1 or DrM61 could differentially alter motor circuit wiring and/or function.

Spinal motor axon pathfinding is distinctively altered between the two sets of Spastin isoform morphants

In view of the morphant locomotor phenotypes, we analysed spinal motor neuron (SMN) development in ATG1 and ATG2 morphant larvae with a special focus on secondary motor neurons (sMN), which are key players in larval fast swimming and startle response behaviours. Immunolabelling of sMN in 72-hpf ATG1 or ATG2 morphant Tg(*Hb9*:GFP) transgenic larvae (56) using zn-5 antibody revealed obvious sMN migratory and/or axon pathfinding defects, which were mainly typical of each morphant class. Indeed, in ATG1 morphants, the rostral nerve appeared misguided in 39% of spinal hemisegments and abnormally grew caudally along the horizontal myoseptum (arrowhead, Figure 3A), a phenotype rarely observed in *COMOsp^{ATG1}* (0.4%) or *MOsp^{ATG2}* (5.9%) injected-larvae (Figure 3, A, B). In contrast, the rostral nerve failed to form in 49.9% of ATG2 morphant

spinal hemisegments (empty arrowhead, Figure 3, A) compared to $MOsp^{ATG1}$ morphant (18%) or $COMOsp^{ATG2}$ control larvae (1.1%; Figure 3, A, C). Furthermore, the dorsal nerve was absent in the majority of both ATG1 (57%) and ATG2 (96%) morphant hemisegments compared to controls (asterisk; $COMOsp^{ATG1}$: 0%; $COMOsp^{ATG2}$: 3%; Figure 3, A, D). *In vivo* time-lapse videomicroscopy showed that some sMN axons of both ATG1 and ATG2 morphants displayed different navigational behaviours at the horizontal myoseptum (i.e. choice point), which strikingly contrasted with the highly stereotyped behaviour of control sMN axons (Figure 3, F and Supplementary Videos 2, A-C). As they reached this key intermediate target, a contingent of ATG1 morphant sMN axons, which should contribute to the rostral nerve, turned in the opposite direction and grew caudally to the lateral myosepta (arrowheads, Figure 3, F), whereas the same population of sMN axons in ATG2 morphants, abnormally grew ventrally beyond this choice point to ultimately fasciculate with the ventral nerve (empty arrowheads, Figure 3, F and Supplementary Videos 2, A-C). Finally, some sMN soma of ATG2 morphants ectopically exited from the spinal cord and migrated along the motor tracts into the periphery, which was never observed in $MOsp^{ATG1}$ - or $COMOsp^{ATG2}$ -injected larvae (arrows, Figure 3, A, E, F and Supplementary Videos 2, A-C). Altogether, these contrasted SMN phenotypes of ATG1 and ATG2 morphants primarily indicated the functional specificity of each Spastin isoform in motor circuit wiring, and secondarily suggested that DrM61 expression in ATG1 morphants was not reduced below the same “critical threshold” as in ATG2 morphants.

DrM1 and DrM61 have critical and non-overlapping functions in SMN development and zebrafish locomotion

To clarify the functional specificity and redundancy of Spastin main isoforms, and confirm the relevance of both morphant phenotypes, we performed rescue and cross-rescue experiments. Human *spastin* transcripts with their 5'UTR and mutated on the first (*M87* mRNAs) or second ATG (*M1* mRNAs) were co-injected with $MOsp^{ATG1}$, $MOsp^{ATG2}$ (Figure 4) or their related control mismatch morpholinos (Supplementary Figure 2). Overexpression of human M1 or M87 spastin in $COMOsp^{ATG2}$ or $COMOsp^{ATG1}$ control larvae did not perturb SMN development (Supplementary Figure 2). As expected, overexpression of human M87 rescued the morphological, locomotor and

SMN defects of ATG2 morphants while human M1 failed to alleviate ATG2 morphant phenotypes (Figure 4, A, C-G). To assess whether this inability of M1 to attenuate the ATG2 morphant defects was linked to defective spastin dosage associated with the very low expression of M1 compared to M87, we replaced the weak consensus Kozak sequence surrounding the first ATG of the human *spastin* cDNA by a robust consensus sequence (*MIK* mRNA) to boost M1 expression up to that of M87 (Figure 4, B). Nevertheless, higher level of exogenous M1 still failed to rescue ATG2 morphant defects (Figure 4, A, C-G) although it did not have any deleterious impact on SMN development in *COMOsp^{ATG2}* or *COMOsp^{ATG1}* co-injected larvae (Supplementary Figure 2). Reciprocally, only human M1 partially or fully rescued the morphological, behavioural and SMN defects of ATG1 morphants, even at low expression levels (Figure 4, H-L) indicating that ATG1 morphant phenotypes can be specifically assigned to the drastic knockdown of endogenous DrM1 and not to the associated decrease in DrM61 levels (Figure 2, B-C). Altogether, these results demonstrate the specificity of each *spastin* morphant phenotypes and unveiled a specific and evolutionary conserved role for spastin main isoforms in vertebrate motor circuit wiring and locomotor activity.

DrM1 controls sMN axon targeting by inhibiting the BMP pathway

M1 spastin was shown to interact with the HSP-causing atlastin-1 (41-42), which controls zebrafish SMN axon pathfinding through the inhibition of the BMP pathway (10). Furthermore, atlastin-1 binds to the HSP protein NIPA1 (46-47) that was equally identified as a BMP inhibitor (11-12). To investigate whether defective BMP signalling could underlie the characteristic pathfinding defect of ATG1 morphant rostral nerve, we first analysed sMN development in 72-hpf larvae injected with morpholinos targeting the translation initiation sites of *atlastin-1* (10) or *NIPA1* transcripts, together with a universal control morpholino (MOscr). Interestingly, the knockdown of each of these BMP inhibitors similarly altered the pathfinding of the rostral nerve, which abnormally grew caudally along the horizontal myoseptum as described for ATG1 spastin morphants (arrowhead; Figure 5, A-B). To determine whether an upregulation of the BMP pathway, independently of any variation in HSP protein expression, was sufficient to induce the aberrant caudal turning of the rostral nerve, we generated a novel Tg(*UAS:CA-BMPRI-HA*) transgenic line, expressing a constitutively active

version of type Ia BMP receptor under the control of a *UAS* promoter and based on a previously published line (57). To temporally control the upregulation of BMP signalling, we crossed these fish with the Tg(*HspGal4-ACR*) line, expressing the transactivator GAL4 under the control of a heat-shock inducible promoter, and heat-shocked the progeny at 42 hpf. We chose this time point to perform the heat shock since it corresponds to the stage at which motor axons composing the rostral nerve reach the horizontal myoseptum where they are subsequently guided towards their final destination. Heat-shocked Tg(*HspGal4-ACR*; *UAS:CA-BMPRI-HA*) transgenic larvae showed caudally-oriented misguided rostral nerves (26%) compared to both heat-shocked Tg(*UAS:CA-BMPRI-HA*) and non heat-shocked Tg(*HspGal4-ACR*; *UAS:CA-BMPRI-HA*) control littermates (arrowheads, Figure 5, C-D). The occurrence of motor axon pathfinding defects in these heat-shocked double transgenic larvae demonstrated that the over-activation of BMP signalling altered sMN axon targeting in a similar way to the loss of DrM1 Spastin, Atlantin-1 or NIPA1 function. Moreover, the co-injection of *MOatl* and *MOsp^{ATG1}* at sub-efficient doses, which did not affect sMN development when injected separately, increased to a great extent the number of misguided rostral nerves compared to the co-injection of *MOatl* and *MOsp^{ATG2}* or that of control morpholinos, which alluded to a cooperative role for DrM1 and Atlantin-1 in the inhibition of the BMP pathway *in vivo* (arrowheads, Figure 5, E-F and Supplementary Figure 3). Finally, we assessed whether a genetic inhibition of the BMP pathway could alleviate the sMN defects of *spastin* ATG1 or *NIPA1* morphants as previously shown for *atlastin-1* knockdown (10). To this aim, *MOsp^{ATG1}*, *COMOsp^{ATG1}*, *MONIPA1* and *MOatl* morpholinos were injected in Tg(*Hsp70:DN-BMPRI-GFP*) transgenic embryos expressing a dominant negative version of type Ia BMP receptor under the control of a heat-shock inducible promoter (58). ATG1, *NIPA1* and *atlastin-1* morphant Tg(*Hsp70:DN-BMPRI-GFP*) larvae, which were subjected to heat shock at 42 hpf, showed a striking reduction in the number of mistargeted rostral nerves at 72 hpf compared to non heat-shocked morphant siblings or heat-shocked control larvae (30% reduction; Figure 5, G-H). However, this partial rescue of sMN axon pathfinding errors by the down-regulation of BMP signalling was not sufficient to rescue the locomotor behaviour and the morphology of ATG1 morphants (Supplementary Figure 3), which suggests that additional factors may contribute to the

locomotor deficit of these morphant larvae. In contrast, the inhibition of BMP signalling had no beneficial impact on ATG2 morphant sMN phenotypes (Supplementary Figure 3). Altogether, these data unveil a specific role for DrM1 Spastin in sMN axon targeting via the inhibition of the BMP pathway.

DrM61 acts as a downstream effector of Neuropilin1a signalling in spinal motor neurons

To unravel the signalling pathway(s) in which spastin short isoform was involved during SMN development, we focused on the migratory motor neuron phenotype that was exclusively identified in ATG2 morphants: the aberrant exit of SMN cell soma from the spinal cord. We then searched for similar migratory defects in published mutants or morphants for signalling cues and associated receptors known to be involved in neuronal migration and axon guidance processes. Notably, the knockdown of the Semaphorin receptor Neuropilin-1a (Nrp1a) was shown to cause the misrouting of SMN cell soma from the spinal cord into the periphery (59). Immunolabelling and time-lapse videomicroscopy of Tg(*Hb9*:GFP) transgenic larvae injected with Nrp1a morpholino (MO*nrp1a*; 59) confirmed that Nrp1a-depleted SMN soma abnormally migrated along spinal motor tracts into the periphery as shown for ATG2 morphant SMN cell bodies (arrows, Figure 6, A-C and Supplementary Video 3). Moreover, the double knockdown of Nrp1a and Spastin DrM61 isoform using sub-efficient doses of MO*nrp1a* and MO*sp*^{ATG2} morpholinos dramatically increased the number of mispositioned SMN soma, compared to the co-injection of MO*nrp1a* and MO*sp*^{ATG1} or the single injection of each morpholino (Figure 6, D, E, Supplementary Figure 4). To determine whether DrM61 could act downstream the Nrp1a signalling pathway, we carried out a “cross-rescue” experiment by overexpressing DrM61, either ubiquitously or selectively in SMN, in a Nrp1a morphant context. To this aim, we co-injected MO*nrp1a* morpholino together with *DrM61Spastin* mRNA (Figure 6, F-G) in Tg(*Hb9*:GFP) embryos or only MO*nrp1a* in triple transgenic Tg(mnGFF7; *UAS*:GFP; *UAS*:DrM61-HA) embryos specifically expressing both the GFP and Spastin short isoform in SMN (Figure 6, H-J). Importantly, both ubiquitous and SMN-targeted overexpression of DrM61 Spastin partially rescued the aberrant exit of SMN soma from the spinal cord of Nrp1a morphants while overexpression of DrM1 failed

to alleviate these migratory defects (Figure 6, F-J). Furthermore, among the remaining misplaced SMN soma in *MONrp1a*-injected Tg(mnGFF7; *UAS*:GFP; *UAS*:DrM61-HA), 89% did not express DrM61-HA (i.e., HA negative; Figure 6, J) while the vast majority of SMN soma (74%), located outside the spinal cord of *MONrp1a*-injected Tg(mnGFF7; *UAS*:GFP; *UAS*:DrM1-HA) transgenic larvae, overexpressed DrM1 (i.e., HA positive; empty arrowheads; Figure 6, H, J). These results thus unveiled a specific role for DrM61 as a downstream effector of Neuropilin-1a signalling in spinal motor neurons.

Discussion

This first functional analysis of spastin main isoforms *in vivo* reveals their critical and specific involvement in two distinct developmental signalling pathways that are both essential for motor circuit wiring and locomotion in a vertebrate model. We here provide compelling evidence for a concerted role for DrM1 spastin and HSP-causing proteins atlastin-1 and NIPA1 in the inhibition of the BMP pathway and unexpectedly unveil a specific role for DrM61 spastin as a downstream effector of Neuropilin-1a signalling in developing motor neurons. Our work thus contributes to a better understanding of the molecular pathogenic mechanisms involved in *SPG4*-linked HSP and suggests that the haploinsufficiency of both M1 and M87 most likely triggers axonal degeneration through parallel pathogenic pathways, including defective Neuropilin-1 and BMP signalling, the latter emerging as a major pathway whose dysregulation is implicated in different forms of HSP.

Multiplying spastin function through alternative translation. Mutations in spastin- encoding *SPG4* are the most frequent cause of HSP, a heterogeneous group of neurodegenerative diseases characterized by a retrograde axonopathy of the corticospinal tracts (21, 24). We and others previously showed that dysregulation of microtubule (MT) dynamics associated with the lack of spastin MT-severing activity is critical for motor axon development and/or homeostasis in invertebrate and vertebrate model organisms (32-34, 36-39). However, due to the growing interest in this major HSP-associated ATPase, the characterisation of its function in various cellular processes has progressively

added to the richness of its functional diversity but simultaneously complicated the comprehensive understanding of *SPG4*-linked HSP physiopathology. Indeed, spastin main isoforms have so far been involved in many cellular processes such as ER shaping (M1; 28), lipid droplet homeostasis (M1; 29), endosomal tubule fission (M1 and M87; 27), although the causal connection between their dysfunction and HSP axonopathy remains to be precisely determined. A major challenge in the field thus aims at deciphering the functional impact of each spastin isoforms, and to identify the HSP-causing culprit(s) among them, which happen(s) to be critical for the development and homeostasis of the motor system. To tackle this key question in *SPG4*-linked HSP, we undertook the first comparative loss-of-function analysis of spastin main isoforms *in vivo*, using a morpholino-based strategy to specifically block its synthesis from each initiation codon during zebrafish development. Our study provides a proof of concept that morpholino-induced knockdown analyses coupled with appropriate rescue experiments and relevant controls represent a suitable and efficient approach to specifically target the expression of distinct protein isoforms resulting from alternative translation, unlike conventional si- or sh-RNA gene silencing technologies that mostly trigger the degradation of the targeted transcript (54). This strategy allowed us to unmask a critical, specific and evolutionary conserved role of each spastin isoform in motor circuit wiring and larval locomotion. While M1 was previously shown to carry out key cellular functions through its exclusive transmembrane hairpin domain (28-29), our functional analysis identifies a specific role for DrM61 in SMN migration and axon targeting, which is further supported by (i) its contrasted subcellular distribution with respect to DrM1, (ii) the striking differences in SMN and locomotor defects between ATG1 and ATG2 morphants and (iii) the inability of M1 to rescue the ATG2 morphant phenotype. Furthermore, M1 was so far suggested to play a major role in HSP pathogenesis based on its enrichment in the adult spinal cord (40), its specific interaction with HSP-causing proteins (28, 41-43) and the deleterious effects associated with the overexpression of M1 truncated or pathogenic forms (60-61). However, our loss-of-function analyses, which reflect the haploinsufficiency associated with the vast majority of *SPG4* mutations (23-25), demonstrate that the loss of DrM61 function, independently of any impact on DrM1 function, is at least as detrimental for developing motor neurons as that of DrM1 in a vertebrate model organism. These results thus highlight the importance of alternative translation in

spastin multifunctionality, as shown for the exponentially growing number of transcripts subjected to alternative translation, which unlimitedly extends the variability and complexity of these protein functions (62). Our data also suggest that haploinsufficiency of each isoform may concomitantly trigger axonal degeneration through distinct pathogenic pathways.

DrM61 acts downstream Neuropilin-1a signalling. We have here identified a specific role for DrM61 Spastin as a downstream effector of the Neuropilin-1a (Nrp1a) pathway in developing motor neurons. Interestingly, the signalling induced by the interaction between the mouse Semaphorin3A (Sema3A) and its receptor Nrp1 was shown to be essential for the midline crossing of corticospinal axons at the pyramidal decussation (63). Furthermore, this axon guidance pathway was incriminated in an early onset form of X-linked HSP (*SPG1*) caused by mutations in the gene encoding the cell adhesion molecule L1-CAM (64), which is a co-receptor of Nrp1 required for Sema3A-mediated axon repulsion (63). Notably, Nrp1-mediated signalling recently emerged as a key pathogenic pathway and thereby an actionable therapeutic target in two other neurodegenerative disorders affecting motor neurons (65-66). Altogether, these data suggest that defective Nrp1 signalling associated with M87 spastin deficiency could contribute to *SPG4*-linked HSP by altering corticospinal tract development and/or maintenance. How would M87 regulate this axon guidance pathway? Since the primary structure of M87 spastin is entirely contained within the M1 sequence, this shorter form probably displays a default functional specificity, which would rely on a fine-tuned expression ratio between spastin long and short isoforms, with M87 being predominantly expressed, as well as on the accurate targeting of M1-containing hexamers to membranous compartments. One plausible hypothesis could be that a pool of cytosolic hexamers exclusively composed of short isoforms (DrM61 or M87) could coordinate the MT disassembly, which is required for Sema3A-induced growth cone collapse or migration, together with the MT-associated Sema3A effector CRMP2 (67). Notably, the knockdown of the zebrafish CRMP2 orthologue also leads to aberrant exit of SMN soma outside the spinal cord (68), as shown for the depletion of DrM61 and Nrp1a. This hypothesis based on a fine-tuned ratio between M1 and M87/M61 may partially explain how intragenic modifiers (e.g., E43Q, S44L, P45Q) worsen the phenotype associated with *SPG4* pathogenic mutations. Indeed,

these modifiers that are located in the N-terminal part of M1 were shown to alter a PEST motif involved in M1 degradation (69) and/or a cryptic promoter partly driving M87 expression (70). These intragenic variants could thus modify the ratio between spastin main isoforms at the expense of M87 and thereby decrease the cytosolic pool of M87 primarily affected by pathogenic mutations, which would reduce Nrp1 signalling below the critical threshold required for development of the corticospinal tracts.

DrM1 is a BMP inhibitor. Over the last decade, the up-regulation of BMP signalling has emerged as a common pathogenic pathway in five different genetic subtypes of HSP (10-11, 13-16). Moreover, it was suggested to contribute to *SPG4*-linked HSP based on the increased phosphorylation of its canonical readout Smad1/5, which was associated with spastin knockdown in HeLa cells (12). We have confirmed these *in vitro* findings by unravelling a specific role for M1 as a BMP inhibitor required for vertebrate motor circuit wiring. The knockdown of DrM1 leads to SMN axon pathfinding defects that strikingly mimic those associated with (i) the depletion of HSP-causing BMP inhibitors Atlastin-1 and NIPA1 or (ii) the overexpression of a constitutively active version of BMPRI; and (iii) these defects are partially rescued by the genetic inhibition of the BMP pathway. Moreover, our functional analysis revealed a cooperative role for two key AD-HSP partners, atlastin-1 and spastin, in the inhibition of the BMP pathway, which ascertains the major role of BMP signalling in HSP physiopathology. In addition, the key role of this signalling pathway in motor circuit homeostasis is further supported by its involvement in the pathogenicity of two other disorders affecting the motor system, amyotrophic lateral sclerosis and spinal muscular atrophy (71-72), as well as in motor axon regeneration following spinal cord injury (17). How would the M1 isoform of the MT-severing spastin participate in the regulation of this pathway? NIPA1, atlastin-1 and spartin were shown to modulate BMP signalling through the regulation of BMP receptor trafficking (11-12, 14, 45). Furthermore, both spastin-depleted HeLa cells and the zebrafish motor growth cones of ATG1 morphants were shown to exhibit abnormal endosomal tubulation, which was associated with defective trafficking of transferrin receptors in the mammalian cells (27). Therefore, M1 most likely acts in concert with these HSP proteins to control BMP receptor trafficking and plasma membrane

concentration, which may influence motor neuron responses to extracellular BMP signals. Interestingly, BMP signalling regulates MT stability and axonal transport homeostasis in the motor neurons of the *Drosophila* (11, 14). Thus, the overactivation of BMP signalling associated with M1 deficiency may contribute to the axonal swelling phenotype of cultured cortical neurons from spastin knockout mice and the iPSC-derived neurons from HSP patients, by enhancing the defects in MT dynamics and axonal transport that are primarily induced by the lack of spastin severing activity (36-39).

In conclusion, the functional analyses of genes responsible for neurodegenerative disorders have gradually unveiled critical molecular links between neurodegenerative processes and key developmental signalling pathways mediated by axon guidance molecules (65-66, 73-74). Although their role as neuronal circuit wirers has been well established, the dissection of their physiological and/or pathological functions in the adult nervous system represents an important area for future research in the field of neurodegenerative disorders, which should provide priceless information on their potential use as tractable therapeutic targets.

Methods

Zebrafish maintenance

Zebrafish embryos (*Danio rerio*) were obtained from natural spawning of wild-type or transgenic Tg(*Hb9*:GFP) (56), Tg(mnGFF7;*UAS*:GFP) (52-53), Tg(*Hsp70*:DN-BMPRI-GFP) (58) and the newly generated Tg(*UAS*:DrM1-Spastin-HA), Tg(*UAS*:DrM61-Spastin-HA), Tg(*UAS*:CA-BMPRI-HA) derived from the published line (57), and Tg(*HspGal4-ACR*) lines. All embryos were maintained at 28°C in E3 medium and staged by hour post-fertilisation (hpf) and gross morphology according to Kimmel *et al.* (75). Pigment formation was prevented by adding 0.2 mM of 1-phenyl-2-thiourea (PTU, Sigma) to the E3 media past the prim-5 stage. To induce transgene expression from *Hsp* promoters, larvae were heat-shocked for 60 minutes at 40°C in pre-warmed E3 medium using a thermomixer (Eppendorf).

Constructs and generation of transgenic lines

Zebrafish *spastin* cDNA was obtained from the IMAGE clone n°4725923, including 121 bases upstream of the ATG initiation codon. It was subsequently amplified and HA-tagged by PCR and cloned into pCS2+ using the XhoI/XbaI restriction sites (pCS2+DrSp-HA). Targeted mutagenesis of the first ATG was performed using the megaprimer PCR method (pCS2+DrSp-HAMut^{ATG1}) while the mutagenesis of the second ATG codon was carried out using the QuickChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene) and a set of complementary primers (pCS2+DrSp-HAMut^{ATG2}).

The DNA constructs used to generate the Tg(*UAS*:DrM1-HA) and Tg(*UAS*:DrM61-HA) transgenic lines were composed by assembling the three elements below in the following order: (i) a SacII-SwaI fragment of plasmid ‘T2 US E1B Cit UAS E1B MCS ACR’ (a kind gift from Sebastian Gerety & David Wilkinson) composed of an ‘alpha-crystallin:mRFP’ cassette for screening purposes (ii) a SwaI-AvrII fragment containing a promoter module made of 5 UAS sites followed by a minimal promoter and short leader sequence (76) and (iii) a SpeI-NotI fragment containing the full-length DrSp-HAMut^{ATG1} or DrSp-HAMut^{ATG2} cDNAs followed by the SV40 3’UTR and polyadenylation signal of the pCS2+ vector. These resulting constructs were cloned into pBluescrit SKI-SceI (77) to yield (*UAS*:DrM61-HA) and (*UAS*:DrM1-HA) plasmids respectively, and injected at 30pg/egg into freshly fertilised zebrafish eggs together with the I-SceI endonuclease (Roche). Injected fish were raised to adulthood and screened for germline transmission by detecting the red fluorescence in the lens of their progeny at 72 hpf. The Tg(*UAS*:DrM1-HA) and Tg(*UAS*:DrM61-HA) transgenic lines were established from these positive carriers.

For the Tg(*UAS*:CA-BMPRI-HA) line, the constitutive active form of BMP type 1a receptor (78) was PCR-amplified and HA-tagged from a ‘pME-MCS-ca-BMPRI-HA’ construct (a kind gift from Elise Cau & Patrick Blader; 57) using the following primers: AvrII-zBMPRIa-CA_FOR: 5’-TACGCGCCT AGGCAATTTGACAATGCGTCAGC-3’ and NotI-HA-zBMPRIa-CA_REV: 5’-TTTTCTTTTGCGG

CCGCTCAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGTGAGATTTTAATGTCTTGAGATTCC-3', then cloned in the place of *spastin* cDNA in the (*UAS:DrM61-HA*) plasmid using the AvrII/NotI restriction sites. Transgenic fish were generated and identified as described above. The Tg(*HspGal4-ACR*) line has been established in David Wilkinson's lab.

Human *spastin* cDNA mutated on the second ATG (encoding M1) was obtained from a pIRESspastin-m87 construct provided by Evan Reid's lab (27). Since this construct had no 5'UTR that is required for the regulation of spastin isoform ratio, we amplified a 245-bp fragment corresponding to human *SPG4* 5'UTR from human genomic DNA (kindly provided by Catalina Betancur) and cloned it in pIRESspastin-m87, using the EcoRI site located upstream the first initiation codon of *SPG4* (primers Nhe-AvrII-spastinUTR_FOR: 5'-attGCTAGCCTAggcccagccaccgactgcagg-3' and Eco-spastinUTR_REV: 5'-ggcGAATTCATtcacagctctcactgcc-3'). *M1-spastin* cDNA including the 5'UTR was next subcloned in the place of zebrafish *spastin* cDNA in the (*UAS:DrM61-HA*) plasmid using AvrII/NotI restriction sites to yield the (*UAS:M1-HA*) construct. In the (*UAS:M1K-HA*) construct, the 5'UTR sequence was removed and the initiation codon was placed immediately after the 5'-ACTTTGAGCTCCTCCACACGAATTGCTAGC-3' Kozak leading sequence, which provides a more favourable translation initiation context. (*UAS:M87-HA*) was generated by targeted mutagenesis of the (*UAS:M1-HA*) construct using the megaprimer PCR method. All human spastin constructs were subcloned in the pCS2+ vector and *in vitro* transcribed using the SP6 mMessage mMachine kit (Ambion).

Morpholinos and RNA injections

Morpholino oligonucleotides (MO) targeting each translation start site of zebrafish *spastin* mRNA and the initiation codon of *NIPA1* mRNA, as well as control mismatch or universal MOs were developed by GeneTools (Philomath, USA) and designed as follows:

- MO_{sp^{ATG1}}: 5'-ATTCATTCACCCTTCTCGGGCTCTC-3';
- MO_{sp^{ATG2}}: 5'-GCTGAAACAGCCACCGAAGAAGCC-3',
- COMO_{sp^{ATG1}}: 5'-ATTGATTCAGCCTTGTCGCGCTGTC-3',

- *COMO_{sp}^{ATG2}*: 5'-GCTCAAACACCCAGCGAACAAAGGC-3',
- *MONIPA1*: 5'-GGGTCTCGTCCATAAATATGTGCGA-3',
- *MOscr*: 5'-CCTCTTACCTCAGTTACAATTTATA-3',

MOs were injected at two-cell stage. *MO_{sp}^{ATG1}*, *COMO_{sp}^{ATG1}* and *MONIPA1* were injected at 0.4 pmol/embryo while *MO_{sp}^{ATG2}*, *COMO_{sp}^{ATG2}*, *MO_{atl}* (10), *MO_{nrrp1a}* (59) and *MOscr* were injected at 0.2 pmol/embryo. For rescue experiments, mRNAs were *in vitro* transcribed from linearized pCS2+ constructs using the SP6 mMessage mMachine kit (Ambion) and injected at one-cell stage at 200pmol per embryon.

Touch-escape response test and manual tracking

Locomotor behaviour of control, spastin morphant and rescued larvae were assessed at 72-hpf by performing a touch-escape response test. A tactile stimulus was applied on each larva with a pair of forceps and their escape behaviour was recorded under a Leica M165 C binocular stereomicroscope equipped with a Leica IC80 HD camera. Swimming speed and covered distance of each larva were quantified using the Manual Tracking plugin (ImageJ software; National Institutes of Health, Bethesda, MD). Stereotypic movement patterns of the touch-evoked startle response were recorded under a Leica M165 FC binocular stereomicroscope equipped with a DFC 345 FX camera. C-bend maximal body curvature angles were manually scored from the videos as described previously (79).

Whole-mount immunohistochemistry

Zebrafish embryos or larvae were fixed in 4% paraformaldehyde for 2 hours at room-temperature, washed with PB-T1% (1% Triton X-100 in PBS), permeabilized in a 0.25% trypsin solution (at 25°C) after 24-hpf, blocked for 2 hours in PB-T1% supplemented with 10% of normal goat serum and subsequently incubated overnight with zn-5 (1/200; ZIRC, University of Oregon), GFP (1/1000; Molecular Probes) and/or HA (1/100; Roche) antibodies. After several washes in PBT1%, larvae

were incubated overnight at 4°C with Alexa Fluor 488 or 555 conjugated Goat anti-mouse, -rabbit or -rat antibodies (1/1000, Molecular Probes). Images were acquired using a fluorescence microscope equipped with an Apotome module (Zeiss, Axiovert 200M) and processed with the ImageJ software. Each figure corresponds to a projection image from a z-stack of 2- μ m thick sections.

In vivo time-lapse videomicroscopy

MO sp^{ATG1} , MO sp^{ATG2} and MOscr-injected Tg(*Hb9*:GFP) transgenic embryos were anesthetized at 40 hpf with tricaine and embedded in 0.8% low melting agarose in a 35-mm glass dish (Iwaki). Time-lapse videomicroscopy recordings of sMN axon navigation were carried out using a Leica DMI 6000B inverted spinning-disk microscope with a 40x/1.25 NA immersion objective over a period of 32 hours. Z-stacks of 1- μ m thick planes were taken over 70 μ m depth every 8 minutes and compiled into time-lapse movie or figure panels.

Cell culture, transfection and immunocytochemistry

COS-7 cells were cultured in DMEM supplemented with 10% foetal calf serum at 37°C under 5% CO₂. cDNA constructs were transfected using Lipofectamine 2000 according to the manufacturer's instructions (Life Technologies) with a DNA:Lipofectamine ratio of 1:1.5. Cells were fixed 24 h post-transfection in a 4% PFA/4% sucrose solution for 20 min, blocked in PBS-BSA3% supplemented with 5% normal goat serum and incubated with HA (1:100, Roche) and Tyrosinated tubulin (1:4000, Sigma) antibodies. After several washes in PBS, cells were incubated with appropriate Alexa Fluor conjugated secondary antibodies.

Western blot analysis

COS-7 cells and zebrafish embryos were lysed in SDS-lysis buffer (25 mM sodium phosphate pH 7.2, 5 mM EDTA, 1% SDS) and SDS sample buffer (0.5 μ l per embryo; 1M Tris-HCl pH 6.8/ 10% glycerol/ 5% β -mercaptoethanol/ 3.5% SDS) respectively, supplemented with a cocktail of protease inhibitors (Roche). A total of 10 μ g of zebrafish protein extracts and 5 μ g of total protein lysates from COS-7 mock and transfected cells were electrophoresed into 10% SDS-PAGE gel and transferred onto nitrocellulose membranes. Immunoblotting was performed after overnight incubation at 4°C with HA (1:5000), spastin86-340 (1/1000; ref 31), H2b (1/16000) or actin (1/10000) antibodies. Immunostained proteins were visualized using appropriate peroxydase-labeled antibodies (Jackson ImmunoResearch) and a chemiluminescence detection system (Santa Cruz Biotechnology). DrM1- and DrM61-levels were estimated by quantifying blot band density normalized to H2b values (ImageJ software).

Statistics

Each experiment has been reproduced at least three times independently. Statistical analyses of spastin isoform expression levels, swimming behaviour and sMN phenotypes were carried out in GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA). Statistical significance was evaluated using the Kruskal–Wallis ANOVA test with Dunn’s post-test for samples assuming non Gaussian distribution or using One-Way ANOVA test with Bonferroni’s post-test for samples assuming Gaussian distribution. Data represent mean \pm SEM. P values less than 0.05 were considered significant.

Acknowledgment

We are indebted to Sebastian Gerety and David Wilkinson for providing us with the Tg(*HspGal4-ACR*) transgenic line and the ‘alpha-crystallin:mRFP’ plasmid for transgenesis. We thank Richard Schwartzmann and Jean-François Gilles from the imaging facility of the IBPS (UPMC), Alex Bois and Stéphane Tronche from the aquatic animal facility of the IBPS for fish care, Catalina Betancur

for human genomic DNA, as well as Sylvie Schneider-Maunoury lab for fruitful discussions and helpful comments. This work was supported by research grants to JH from the Association Française contre les Myopathies (AFM), the UPMC Emergence programme and the Association Strümpell-Lorrain (ASL). CF was a recipient of an AFM post-doctoral fellowship before becoming an INSERM Research Fellow.

Author Contributions

JH initially conceived the project in CH's lab. In JH's lab, CF designed all the experiments and interpreted the data together with NJ. NJ, CF and FG performed the experiments with the contribution of DTM for zebrafish injections and SDG for mutagenesis. RA and ER provided human spastin constructs and antibody. ER, FG and CH had insightful comments on the project. CF wrote the manuscript with the editing of JH.

Competing financial interests

The authors declare no competing financial interests.

References

1. Miyazono K, et al. Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction. *J Biochem.* 2010;147(1):35-51.
2. Wang RN, et al. Bone Morphogenetic Protein (BMP) signaling in development and human diseases. *Genes Dis.* 2014;1(1):87-105.
3. Bayat V, et al. The BMP signaling pathway at the Drosophila neuromuscular junction and its links to neurodegenerative diseases. *Curr Opin Neurobiol.* 2011;21(1):182-188.
4. Liu A, Niswander LA. Bone morphogenetic protein signalling and vertebrate nervous system development. *Nat Rev Neurosci.* 2005;6(12):945-954.
5. Bond AM, et al. The dynamic role of bone morphogenetic proteins in neural stem cell fate and maturation. *Dev Neurobiol.* 2012;72(7):1068-1084.

6. Sabo JK, et al. Effects of bone morphogenic proteins on neural precursor cells and regulation during central nervous system injury. *Neurosignals*. 2009;17(4):255-264.
7. Katsuno M, et al. Transforming growth factor- β signaling in motor neuron diseases. *Curr Mol Med*. 2011;11(1):48-56
8. Zou Y, Lyuksyutova AI. Morphogens as conserved axon guidance cues. *Curr Opin Neurobiol*. 2007; 17(1): 22-28.
9. Colavita A, et al. Pioneer axon guidance by UNC-129, a *C.elegans* TGF-beta. *Science*. 1998; 281(5377):706-709.
10. Fassier C, et al. Zebrafish atlastin controls motility and spinal motor axon architecture via inhibition of the BMP pathway. *Nat Neurosci*. 2010;13(11):1380-1387.
11. Wang X, et al. *Drosophila* spichthyin inhibits BMP signaling and regulates synaptic growth and axonal microtubules. *Nat Neurosci*. 2007;10(2):177-185.
12. Tsang HT et al. The hereditary spastic paraplegia proteins NIPA1, spastin and spartin are inhibitors of mammalian BMP signalling. *Hum Mol Genet*. 2009;18(20):3805-3821.
13. Renvoisé B, et al. *Spg20*^{-/-} mice reveal multimodal functions for Troyer syndrome protein spartin in lipid droplet maintenance, cytokinesis and BMP signaling. *Hum Mol Genet*. 2012;21(16):3604-3618.
14. Nahm M, et al. Spartin regulates synaptic growth and neuronal survival by inhibiting BMP-mediated microtubule stabilization. *Neuron*. 2013;77(4):680-695.
15. Song Y, et al. Knockdown of *Pnpla6* protein results in motor neuron defects in zebrafish. *Dis Model Mech*. 2013;6(2):404-413.
16. Mao F, et al. Identification and functional analysis of a *SLC33A1*: c.339T>G (p.Ser113Arg) variant in the original *SPG42* family. *Hum Mutat*. 2015;36(2):240-9.
17. Zhong J, Zou H. BMP signaling in axon regeneration. *Curr Opin Neurobiol*. 2014;27:127-134.
18. Tesson C, et al. Delving into the complexity of hereditary spastic paraplegias: how unexpected phenotypes and inheritance modes are revolutionizing their nosology. *Hum Genet*. 2015;134(6):511-538.
19. Blackstone C, et al. Hereditary spastic paraplegias: membrane traffic and the motor pathway. *Nat Rev Neurosci*. 2011;12(1):31-42.
20. Lo Giudice T et al. Hereditary spastic paraplegia: clinical-genetic characteristics and evolving molecular mechanisms. *Exp Neurol*. 2014; 261:518-539.
21. Hazan J, et al. Spastin, a new AAA protein, is altered in the most frequent form of autosomal dominant spastic paraplegia. *Nat Genet*. 1999; 23(3):296-303.

22. Evans KJ, et al. Linking axonal degeneration to microtubule remodeling by Spastin-mediated microtubule severing. *J Cell Biol.* 2005;168(4):599-606.
23. Roll-Mecak A, et al. Structural basis of microtubule severing by the hereditary spastic paraplegia protein spastin. *Nature.* 2008;451(7176):363–367.
24. Fonknechten N, et al. Spectrum of SPG4 mutations in autosomal dominant spastic paraplegia. *Hum Mol Genet.* 2000;9(4):637-644.
25. Riano E, et al. Pleiotropic effects of spastin on neurite growth depending on expression levels. *J Neurochem.* 2009;108(5):1277-1288.
26. Lumb J, et al. The AAA ATPase spastin links microtubule severing to membrane modelling. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1823(1):192-197.
27. Allison R, et al. An ESCRT-spastin interaction promotes fission of recycling tubules from the endosome. *J Cell Biol.* 2013;202(3):527-543.
28. Park SH, et al. Hereditary spastic paraplegia proteins REEP1, spastin, and atlastin-1 coordinate microtubule interactions with the tubular ER network. *J Clin Invest.* 2010;120(4):1097-1110
29. Papadopoulos C, et al. Spastin binds to lipid droplets and affects lipid metabolism. *PLoS Genet.* 2015;11(4):e1005149.
30. Vietri M, et al. Spastin and ESCRT-III coordinate mitotic spindle disassembly and nuclear envelope sealing. *Nature.* 2015;522(7555):231-235.
31. Connell JW, et al. Spastin couples microtubule severing to membrane traffic in completion of cytokinesis and secretion. *Traffic.* 2009;10(1):42-56.
32. Trotta N, et al. The hereditary spastic paraplegia gene, spastin, regulates microtubule stability to modulate synaptic structure and function. *Curr Biol.* 2004;14(13):1135-1147.
33. Sherwood NT, et al. Drosophila spastin regulates synaptic microtubule networks and is required for normal motor function. *PLoS Biol.* 2004;2(12):e429.
34. Wood JD, et al. The microtubule-severing protein Spastin is essential for axon outgrowth in the zebrafish embryo. *Hum Mol Genet.* 2006; 15(18):2763-2771.
35. Yu W, et al. The microtubule-severing proteins spastin and katanin participate differently in the formation of axonal branches. *Mol Biol Cell.* 2008;19(4):1485-1498.
36. Tarrade A, et al. A mutation of spastin is responsible for swellings and impairment of transport in a region of axon characterized by changes in microtubule composition. *Hum Mol Genet.* 2006;15(24):3544-3558.
37. Fassier C, et al. Microtubule-targeting drugs rescue axonal swellings in cortical neurons from spastin knockout mice. *Dis Model Mech.* 2013;6(1):72-83.

38. Denton KR, et al. Loss of spastin function results in disease-specific axonal defects in human pluripotent stem cell-based models of hereditary spastic paraplegia. *Stem Cells*. 2014; 32(2):414-423.
39. Havlicek S, et al. Gene dosage-dependent rescue of HSP neurite defects in SPG4 patients' neurons. *Hum Mol Genet*. 2014; 23(10):2527-2541
40. Claudiani P, et al. Spastin subcellular localization is regulated through usage of different translation start sites and active export from the nucleus. *Exp Cell Res*. 2005;309(2):358-369.
41. Sanderson CM, et al. Spastin and atlastin, two proteins mutated in autosomal-dominant hereditary spastic paraplegia, are binding partners. *Hum Mol Genet*. 2006;15(2):307-318.
42. Evans K, et al. Interaction of two hereditary spastic paraplegia gene products, spastin and atlastin, suggests a common pathway for axonal maintenance. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103(28):10666-10671.
43. Montenegro G, et al. Mutations in the ER-shaping protein reticulon 2 cause the axon-degenerative disorder hereditary spastic paraplegia type 12. *J Clin Invest*. 2012;122(2):538-544.
44. Zhao X, et al. Mutations in a newly identified GTPase gene cause autosomal dominant hereditary spastic paraplegia. *Nat Genet*. 2001;29(3):326-331.
45. Zhao J, et al. Hereditary spastic paraplegia-causing mutations in atlastin-1 interfere with BMPRII trafficking. *Mol Cell Neurosci*. 2013;52:87-96.
46. Rainier S et al. NIPA1 gene mutations cause autosomal dominant hereditary spastic paraplegia (SPG6). *Am J Hum Genet*. 2003; 73(4):967-971.
47. Botzolakis EJ, et al. The effect of HSP-causing mutations in SPG3A and NIPA1 on the assembly, trafficking, and interaction between atlastin-1 and NIPA1. *Mol Cell Neurosci*. 2011;46(1):122-135.
48. Butler R, et al. Genetic and chemical modulation of spastin-dependent axon outgrowth in zebrafish embryos indicates a role for impaired microtubule dynamics in hereditary spastic paraplegia. *Dis Model Mech*. 2010; 3(11-12):743-751.
49. Svenson IK, et al. Identification and expression analysis of spastin gene mutations in hereditary spastic paraplegia. *Am J Hum Genet*. 2001;68(5):1077-1085.
50. Matsushita-Ishiodori Y, et al. The *C. elegans* homologue of the spastic paraplegia protein, spastin, disassembles microtubules. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;359(1):157-162.
51. Errico A, et al. Spastin interacts with the centrosomal protein NA14, and is enriched in the spindle pole, the midbody and the distal axon. *Hum Mol Genet*. 2004;13(18):2121-2132.
52. Asakawa K, et al. Genetic dissection of neural circuits by Tol2 transposon-mediated Gal4 gene and enhancer trapping in zebrafish. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2008;105(4):1255-1260.

53. Asakawa K, et al. Cellular dissection of the spinal cord motor column by BAC transgenesis and gene trapping in zebrafish. *Frontiers in Neural Circuits*. 2013;7:100.
54. Summerton J. Morpholino Antisense Oligomers: The Case for an RNase H-Independent Structural Type. *Bioch Biophys Acta*. 1999;1489(1):141-158.
55. McClenahan P, et al. Fin-tail coordination during escape and predatory behavior in larval zebrafish. *PLoS One*. 2012;7(2):e32295.
56. Flanagan-Steet H, et al. M.A. Neuromuscular synapses can form in vivo by incorporation of initially aneural postsynaptic specializations. *Development*. 2005; 132(20):4471-4481.
57. Quillien A, et al. BMP signaling orchestrates photoreceptor specification in the zebrafish pineal gland in collaboration with Notch. *Development*. 2011;138(11):2293-2302.
58. Pyati UJ, et al. Transgenic zebrafish reveal stage-specific roles for Bmp signaling in ventral and posterior mesoderm development. *Development*. 2005;132(10):2333-2343.
59. Feldner J, et al. Neuropilin-1a is involved in trunk motor axon outgrowth in embryonic zebrafish. *Dev Dyn*. 2005;234(3):535-549.
60. Solowska JM, et al. Quantitative and functional analyses of spastin in the nervous system: implications for hereditary spastic paraplegia. *J Neurosci*. 2008;28(9):2147-2157.
61. Solowska JM, et al. Pathogenic mutation of spastin has gain-of-function effects on microtubule dynamics. *J Neurosci*. 2014;34(5):1856-1867.
62. de Klerk E, 't Hoen PA. Alternative mRNA transcription, processing, and translation: insights from RNA sequencing. *Trends Genet*. 2015;31(3):128-139.
63. Castellani V, et al. Analysis of the L1-deficient mouse phenotype reveals cross-talk between Sema3A and L1 signaling pathways in axonal guidance. *Neuron*. 2000; 27(2):237-249.
64. Jouet M, et al. X-linked spastic paraplegia (SPG1), MASA syndrome and X-linked hydrocephalus result from mutations in the L1 gene. *Nat Genet*. 1994; 7(3):402-407
65. Venkova K, et al. Semaphorin 3A signaling through neuropilin-1 is an early trigger for distal axonopathy in the SOD1G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2014;73(7):702-713.
66. He W, et al. CMT2D neuropathy is linked to the neomorphic binding activity of glycyl-tRNA synthetase. *Nature*. 2015;526(7575):710-714.
67. Uchida Y, et al. Semaphorin3A signaling is mediated via sequential Cdk5 and GSK3beta phosphorylation of CRMP2: Implication of common phosphorylating mechanism underlying axon guidance and Alzheimer's disease. *Genes Cells*. 2005;10(2):165-179

68. Morimura R, et al. Phosphorylation of Dpsyl2 (CRMP2) and Dpsyl3 (CRMP4) is required for positioning of caudal primary motor neurons in the zebrafish spinal cord. *Dev Neurobiol.* 2013;73(12):911-920.
69. Schickel J, et al. Isoform-specific increase of spastin stability by N-terminal missense variants including intragenic modifiers of SPG4 hereditary spastic paraplegia. *Eur J Neurol.* 2007;14(12):1322-1328.
70. Mancuso G, Rugarli EI. A cryptic promoter in the first exon of the SPG4 gene directs the synthesis of the 60-kDa spastin isoform. *BMC Biol.* 2008;6:31.
71. Chang HC, et al. Modelling spinal muscular atrophy in *Drosophila*. *PLoS ONE* 2008; 3:e3209.
72. Ratnaparkhi A, et al. A *drosophila* model of ALS : human ALS-associated mutation in VAP33A suggests a dominant negative mechanism. *PLoS ONE* 2008; 3:e2334
73. Bai G, et al. Presenilin-dependent receptor processing is required for axon guidance. *Cell.* 2011;144(1):106-118.
74. Van Hoecke A, et al. EPHA4 is a disease modifier of amyotrophic lateral sclerosis in animal models and in humans. *Nat Med.* 2012;18(9):1418-1422.
75. Kimmel CB, et al. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dyn.* 1995; 203(3):253–310.
76. Baraban M, et al. Zebrafish embryonic neurons transport messenger RNA to axons and growth cones in vivo. *J Neurosci.* 2013;33(40):15726-15734.
77. Grabher C, et al. Highly efficient zebrafish transgenesis mediated by the meganuclease I-SceI. *Methods Cell Biol.* 2004;77:381-401.
78. Nikaido M, et al. In vivo analysis using variants of zebrafish BMPR-IA: range of action and involvement of BMP in ectoderm patterning. *Development.* 1999;126(1):181-190.
79. Jain RA, et al. Mirror movement-like defects in startle behavior of zebrafish *dcc* mutants are caused by aberrant midline guidance of identified descending hindbrain neurons. *J Neurosci.* 2014;34(8):2898-2909.

Legends to figures

Figure 1: Two main spastin isoforms are synthesized during zebrafish development through alternative usage of two initiation codons.

(A) Alignment of *spastin* cDNA sequences surrounding the first and second ATG from different vertebrate species. Kozak sequences surrounding the first and second ATG are boxed in red and blue respectively. Asterisks indicate conserved nucleotides. (B) Schematic representation of the different spastin constructs used in the present study. Crosses indicate mutagenized ATG. (C-E) Zebrafish *spastin* transcript drives the synthesis of two main spastin isoforms through alternative translation start sites. (C) Western blot analysis of Spastin expression in COS-7 cells transfected or not (not transfected, NT) with the different spastin constructs (see panel B) using HA and spastin86-340 antibodies. (D) Both zebrafish Spastin isoforms display a microtubule-severing activity *in vitro*. Immunolabelling of Spastin and microtubules in COS-7 cells overexpressing DrM1 or DrM61-HA using HA (red) and Tyrosinated tubulin (green) antibodies. Dotted lines surround transfected cells. Both exogenous DrM1 and DrM61 dismantle the microtubule network. Scale bar: 20 μ m. (E) Western blot analysis of exogenous Spastin expression from protein extracts of tailbud embryos injected or not with *in vitro* transcribed mRNAs from the different *spastin* constructs using HA antibody. (F) The expression ratio between Spastin isoform varies during zebrafish development. Western blot analysis of Spastin main isoforms during zebrafish development, using spastin86-340 antibody. Proteins extracts from tailbud embryos that were injected with *spastin-HA* mRNA and revealed using an HA antibody, were used as a benchmark to identify endogenous full-length DrM1 and DrM61. (G) Spastin exon 4 is alternatively spliced during zebrafish development. RT-PCR analysis of *spastin* transcripts at both the tailbud stage and 24 hpf using primers flanking the exon 4 of the zebrafish *spastin* gene. (H) Distinct subcellular distribution of Spastin main isoforms in spinal motor neurons *in vivo*. Immunolabelling of 28-hpf Tg(mnGFF7;*UAS*:DrM1-HA) and Tg(mnGFF7;*UAS*:DrM61-HA) transgenic embryos with an HA antibody. Arrows point out the punctate distribution of DrM1-Spastin along the axon shaft while empty arrowheads indicate its specific enrichment in spinal motor growth cones. Scale bars: 10 μ m.

Figure 2: The knockdown of each *spastin* isoform differentially alters larval locomotion.

(A) The knockdown of Spastin main isoforms using a morpholino-based strategy. $MOsp^{ATG1}$ and $MOsp^{ATG2}$ morpholinos were designed to block Spastin synthesis from the first (M1) or the second ATG (M61). (B) Western blot analysis showing the efficiency of Spastin isoform knockdown. Spastin expression was analysed in protein extracts from tailbud embryos injected with $MOsp^{ATG1}$, $MOsp^{ATG2}$ or their corresponding control morpholinos using an HA antibody. H2b was used as a loading control. (C) Quantification of DrM1 and DrM61 band density normalised to H2b values (A.U., arbitrary units), from four independent experiments. *** $p \leq 0.001$; One-Way ANOVA test with Bonferroni's post test. Error bars are SEM. (D) Overall morphology (upper panels) and locomotor behaviour (bottom panels) of 72-hpf larvae injected with $MOsp^{ATG1}$ (n=301), $MOsp^{ATG2}$ (n=182) or control morpholinos ($COMOsp^{ATG1}$, n=199 and $COMOsp^{ATG2}$, n=194). Tracking analysis of 72-hpf control and morphant larvae in a touch-escape response test. Each line represents the trajectory of one larva after touch stimulation while the dotted circle radius symbolizes the mean swimming distance covered by all larvae. Scale bars: 1mm. (E) Quantification of the mean swimming distance. (F) Quantification of the mean swimming speed. (G-H) Touch-evoked startle response of 72-hpf $COMOsp^{ATG1}$ (n=25), $COMOsp^{ATG2}$ (n=24), $MOsp^{ATG1}$ (n=48) and $MOsp^{ATG2}$ (n=46) larvae. (G) Representative time series of control and *spastin* morphant larvae responding to a tactile stimulation. Arrowheads point out the characteristic high body curvature (called C-bend), occurring after the touch stimulation. ATG2 morphants are unable to make the C-bend movement. Scale bar: 2mm. (H) Maximal C-bend body curvature angle of the startle responses. (E-F, H) *** $p \leq 0.001$; Kruskal-Wallis ANOVA test with Dunn's post test. Error bars are SEM.

Figure 3: ATG1 and ATG2 morphants exhibit different spinal motor neuron defects.

(A) Immunolabelling of secondary motor neurons (sMN) in 72-hpf $COMOsp^{ATG1}$ (n=29), $COMOsp^{ATG2}$ (n=29), $MOsp^{ATG1}$ (n=41) and $MOsp^{ATG2}$ (n=32) Tg(*Hb9*:GFP) transgenic larvae using zn-5 antibody. Lateral views of the trunk, anterior to the left. Dotted lines indicate the horizontal myoseptum (i.e., axon guidance choice point). Arrowheads point out misguided rostral nerves of ATG1

morphants while arrows indicate the ectopic sorting of sMN soma from the spinal cord of ATG2 morphants. Empty arrowheads and asterisks indicate missing rostral and dorsal nerves respectively, in ATG1 and ATG2 morphant spinal hemisegments. Scale bar: $50\mu\text{m}$. **(B-E)** Quantifications of sMN defects in at least 24 spinal hemisegments of 72-hpf control and *spastin* morphant larvae. * $p\leq 0.05$; *** $p\leq 0.001$; Kruskal–Wallis ANOVA test with Dunn’s post test. Error bars are SEM. **(F)** Distinctive navigational behaviour of ATG1 and ATG2 morphant sMN axons at the choice point. Representative stills of time-lapse recordings of sMN axon outgrowth monitored in 32 spinal hemisegments of 40 to 72-hpf Tg(*Hb9*:GFP) transgenic larvae injected with $\text{MO}sp^{ATG1}$, $\text{MO}sp^{ATG2}$ or a control morpholino (MOscr). Arrowheads indicate the aberrant caudal turning of ATG1 morphant sMN rostral axons at the horizontal myoseptum (dotted line) while empty arrowheads point out the erroneous ventral growth of ATG2 morphant sMN axons beyond this choice point. Arrows track the aberrant migration of sMN soma along motor tracts of ATG2 morphants. Scale bar: $50\mu\text{m}$.

Figure 4: Spastin main isoforms have non-overlapping functions in spinal motor neuron development and locomotor behaviour.

(A-G) Rescue experiments of ATG2 morphant phenotypes by *M1*, *M1K* or *M87* mRNAs. **(B)** Western blot analysis (bottom panel) of exogenous spastin expression using an HA antibody in wild-type embryos injected with human *spastin* (*SPG4*) mRNAs used for rescue experiments and schematized in the upper panel. The Kozak sequence surrounding the first ATG of *M1* transcript has been replaced by an optimal consensus sequence (*M1K* mRNA) to boost M1 expression. Actin was used as a loading control. **(H-L)** Rescue experiments of ATG1 morphant phenotypes by *M1*, *M1K* or *M87* mRNAs. **(A, H; upper panels)** Immunolabelling of secondary motor neurons (sMN) in 72-hpf control, morphant and “rescued” (i.e., co-injected with $\text{MO}sp^{ATG1}$ or $\text{MO}sp^{ATG2}$ together with each version of human *spastin* mRNAs) Tg(*Hb9*:GFP) larvae using zn-5 and GFP antibodies. **(A)** Arrows, empty arrowheads and asterisks indicate mispositioned sMN, missing rostral and dorsal nerves, respectively. **(H)** Arrowheads indicate misguided rostral nerves. Scale bars, $50\mu\text{m}$. **(A, H; middle panels)** Overall morphology of 72-hpf control, morphant and “rescued” larvae. **(A)** Arrowheads point out yolk tube agenesis and asterisks indicate smaller eyes. **(H)** Arrows indicate curved tails. Scale

bars: 1mm. **(A, H; bottom panels)** Tracking analysis of 72-hpf control, morphants and “rescued” larvae in a touch-escape response test. Each line shows the trajectory of one larva after the stimulus. Dotted circle radius symbolizes the mean swimming covered distance. Scale bars: 1mm. **(C-G and I-L)** Quantifications of sMN defects in 24 spinal hemisegments (C-E and I-J), mean swimming covered distances (F and K) and speed (G and L) of 72-hpf control, morphant and “rescued” larvae. N value for each larval group has been indicated under the corresponding histogram bar. * $p \leq 0.05$; *** $p \leq 0.001$ versus control larvae; ## $p \leq 0.01$; ### $p \leq 0.001$ versus morphants; Kruskal–Wallis ANOVA test with Dunn’s post test. Error bars are SEM.

Figure 5: DrM1 controls secondary motor axon targeting through BMP inhibition like Atlantin-1 and NIPA1.

(A, C, E, G) Immunolabelling of secondary motor neurons (sMN) at 72 hpf using zn-5 (A, G), zn-5 and HA (C) or zn-5 and GFP antibodies (E). Lateral views of the trunk, anterior to the left. Arrowheads indicate misguided rostral nerves. Scale bars: $50\mu\text{m}$. **(B, D, F, H)** Mean percentage of misguided rostral nerves. Quantifications were performed on 24 spinal hemisegments per larva. The N value for each larval group has been indicated under the corresponding histogram bar. ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ versus internal controls; \$\$\$ $p \leq 0.001$ for co-injection comparison; # $p \leq 0.05$ versus morphant larvae; Kruskal–Wallis ANOVA test with Dunn’s post test. Error bars are SEM. **(A-B)** sMN analysis in larvae injected with MO_{sp}^{ATG1} , MO_{atl} , $MONIPA1$ or control (MO_{scr}) morpholinos. **(C-D)** sMN analysis in non-heat-shocked or heat-shocked $Tg(HspGal4-ACR;UAS:CA-BMPRI-HA)$ and heat-shocked $Tg(HspGal4-ACR)$ transgenic larvae. **(E-F)** sMN analysis in larvae injected with sub-efficient doses of MO_{sp}^{ATG1} , MO_{sp}^{ATG2} or MO_{atl} morpholinos or co-injected with the same sub-efficient doses of MO_{atl} and MO_{sp}^{ATG1} or MO_{sp}^{ATG2} morpholinos. **(G-H)** sMN analysis in non-heat-shocked or heat-shocked $Tg(Hsp70:DN-BMPRI-GFP)$ transgenic larvae injected with MO_{sp}^{ATG1} , $COMO_{sp}^{ATG1}$, MO_{atl} , $MONIPA1$ and MO_{scr} morpholinos.

Figure 6: DrM61 acts as a downstream effector of Neuropilin-1a signalling in motor neurons.

(**A-C**) *Neuropilin-1a* (*nrp1a*) morphants show misrouted motoneuron soma as shown for ATG2 morphants. (**A**) Analysis of secondary motor neurons (sMN) in 72-hpf Tg(*Hb9*:GFP) transgenic larvae injected with *MOnrp1a*, *MOsp^{ATG2}* or *MOscr* morpholinos using zn-5 and GFP antibodies. (**B**) Representative stills of time-lapse recordings showing SMN behaviour in 40 to 72-hpf Tg(*Hb9*:GFP) transgenic larvae injected with *MOnrp1a* (n=5 larvae; n=32 spinal hemisegment monitored). Arrows track the aberrant migration of SMN soma along motor axon tracts of *Nrp1a* morphants. Scale bar: 10 μ m. (**D**) Spinal motor neuron (SMN) analysis in 72-hpf Tg(*Hb9*:GFP) transgenic larvae injected with sub-efficient doses of *MOsp^{ATG1}*, *MOsp^{ATG2}* or *MOnrp1a* or co-injected with the same sub-efficient doses of *MOnrp1a* and *MOsp^{ATG1}* or *MOsp^{ATG2}* morpholinos. (**F**) SMN analysis in 72-hpf Tg(*Hb9*:GFP) transgenic larvae injected with control (*MOscr*) or *MOnrp1a* morpholinos or co-injected with *MOnrp1a* and *DrM1*- or *DrM61-spastin* mRNA. (**H**) SMN analysis in 72-hpf Tg(mnGFF7;*UAS*:GFP), Tg(mnGFF7;*UAS*:GFP;*UAS*:DrM61-HA) and Tg(mnGFF7; *UAS*:GFP;*UAS*:DrM1-HA) transgenic larvae using HA and GFP antibodies. (**A**, **D**, **F**, **H**) Lateral views of the trunk, anterior to the left. Arrows indicate mispositioned SMN soma. Scale bars: 50 μ m. (**H**) Empty arrowheads indicate misplaced HA-positive SMN. (**C**, **E**, **G**, **I**) Mean number of mispositioned SMN per larva (quantified on 24 spinal hemisegments/larva). (**J**) Percentage of misplaced HA-positive or -negative SMN per larva (quantified on 24 spinal hemisegments/larva). (**C**, **E**, **G**, **I-J**) The number of larvae analysed per group (n) is mentioned under each corresponding histogram bar. **p \leq 0.01; ***p \leq 0.001 versus internal controls; \$\$\$p \leq 0.001 versus single injection of each morpholino ###p \leq 0.001 versus morphant larvae; ††p \leq 0.01; †††p \leq 0.001 HA-positive versus -negative SMN; Kruskal–Wallis ANOVA test with Dunn’s post test. Error bars are SEM.

Figures

Figure 1: Two main spastin isoforms are synthesized during zebrafish development through alternative usage of two initiation codons.

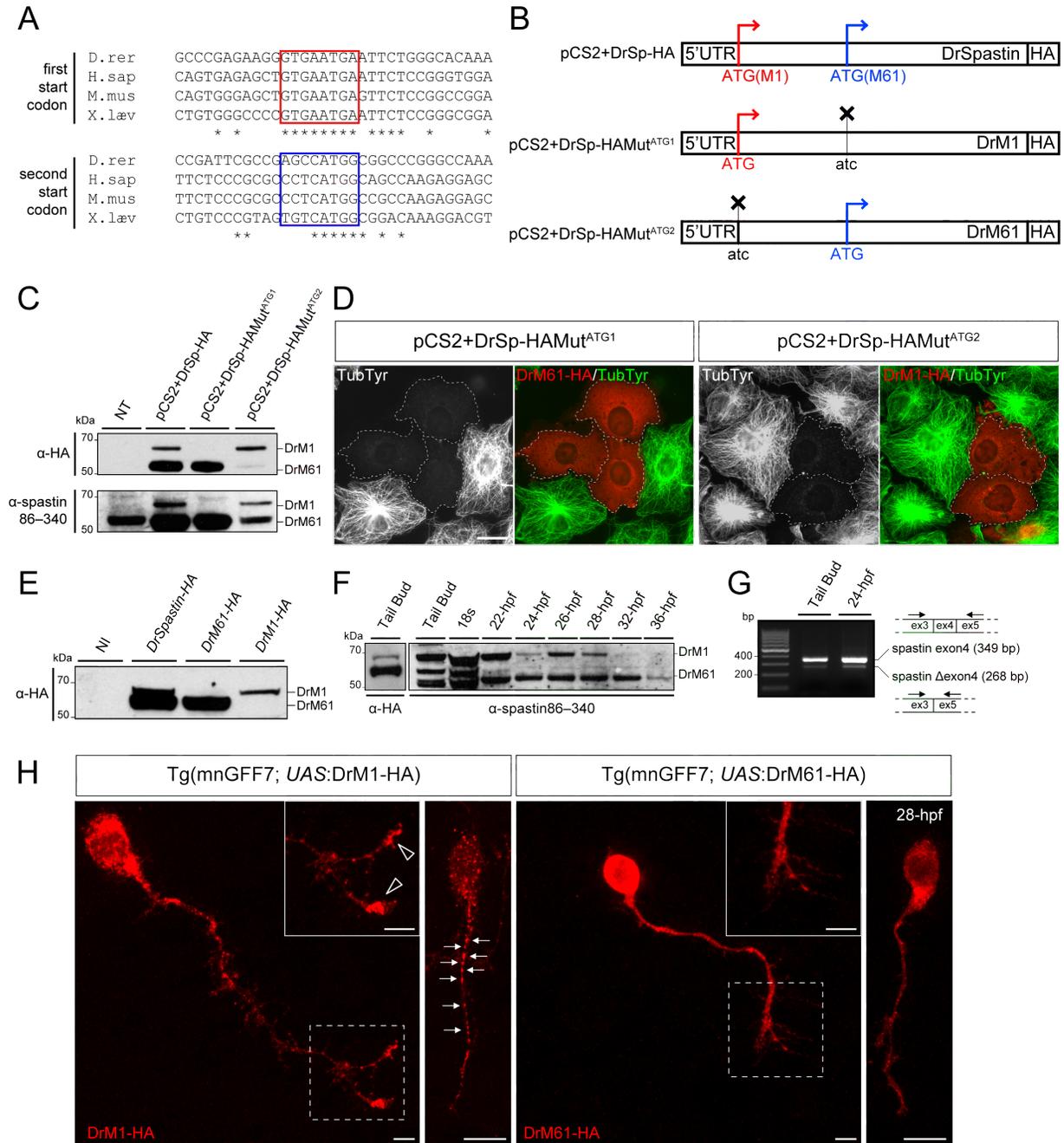


Figure 2: The knockdown of each *spastin* isoform differentially alters larval locomotion.

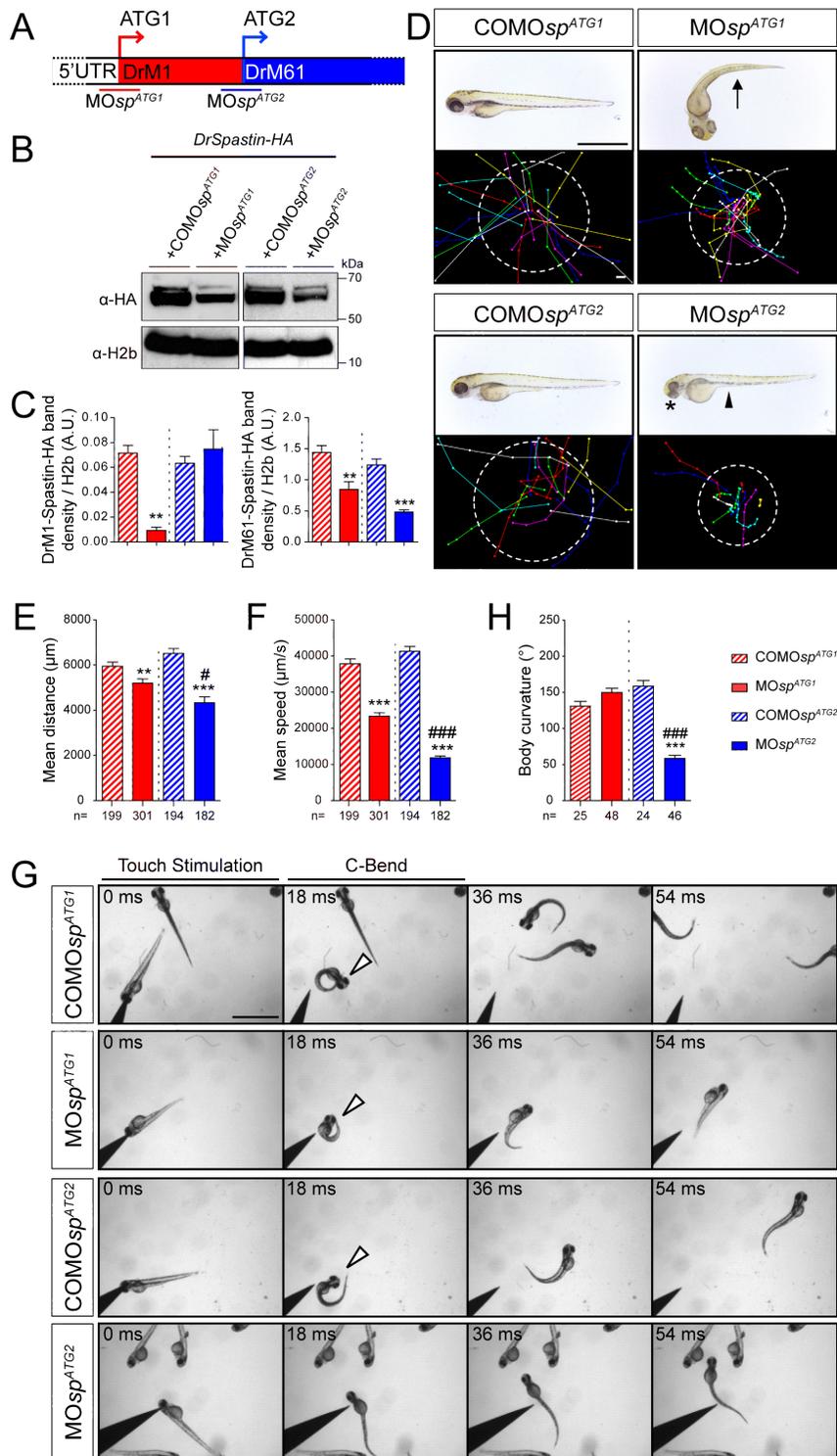


Figure 3: ATG1 and ATG2 morphants exhibit different spinal motor neuron defects.

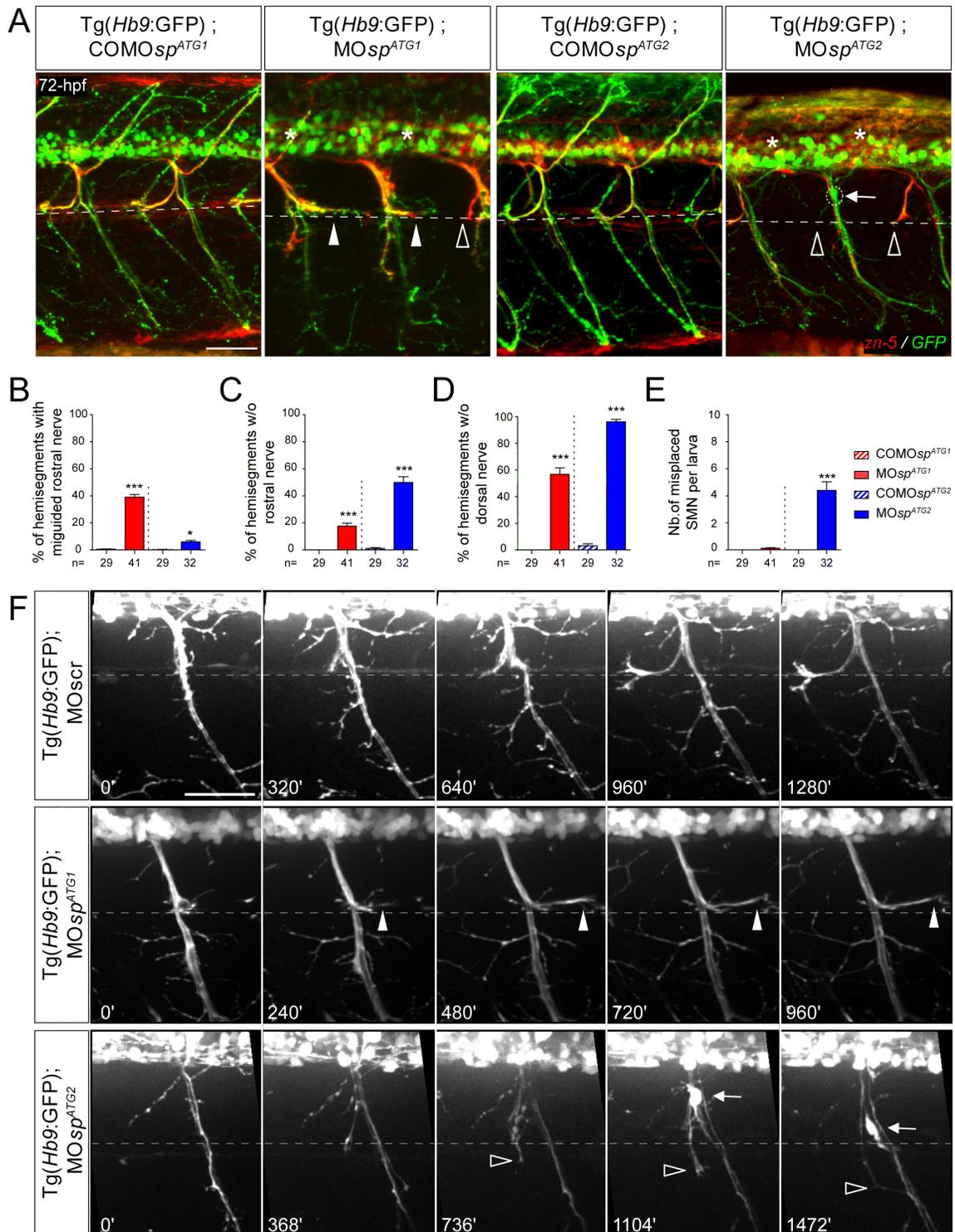


Figure 4: Spastin main isoforms have non-overlapping functions in spinal motor neuron development and locomotor behaviour.

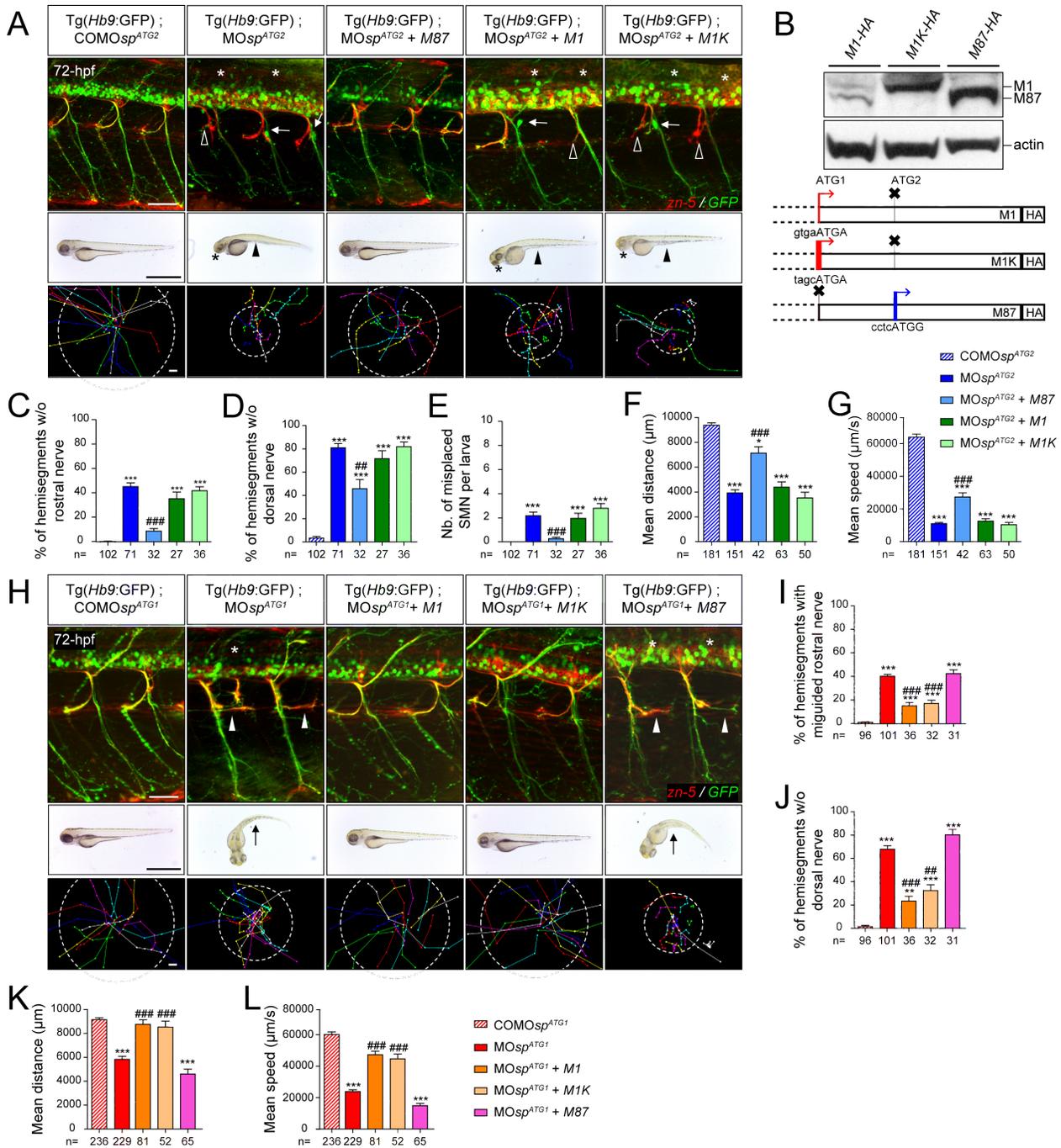


Figure 5: DrM1 controls secondary motor axon targeting through BMP inhibition like Atlantin-1 and NIPA1.

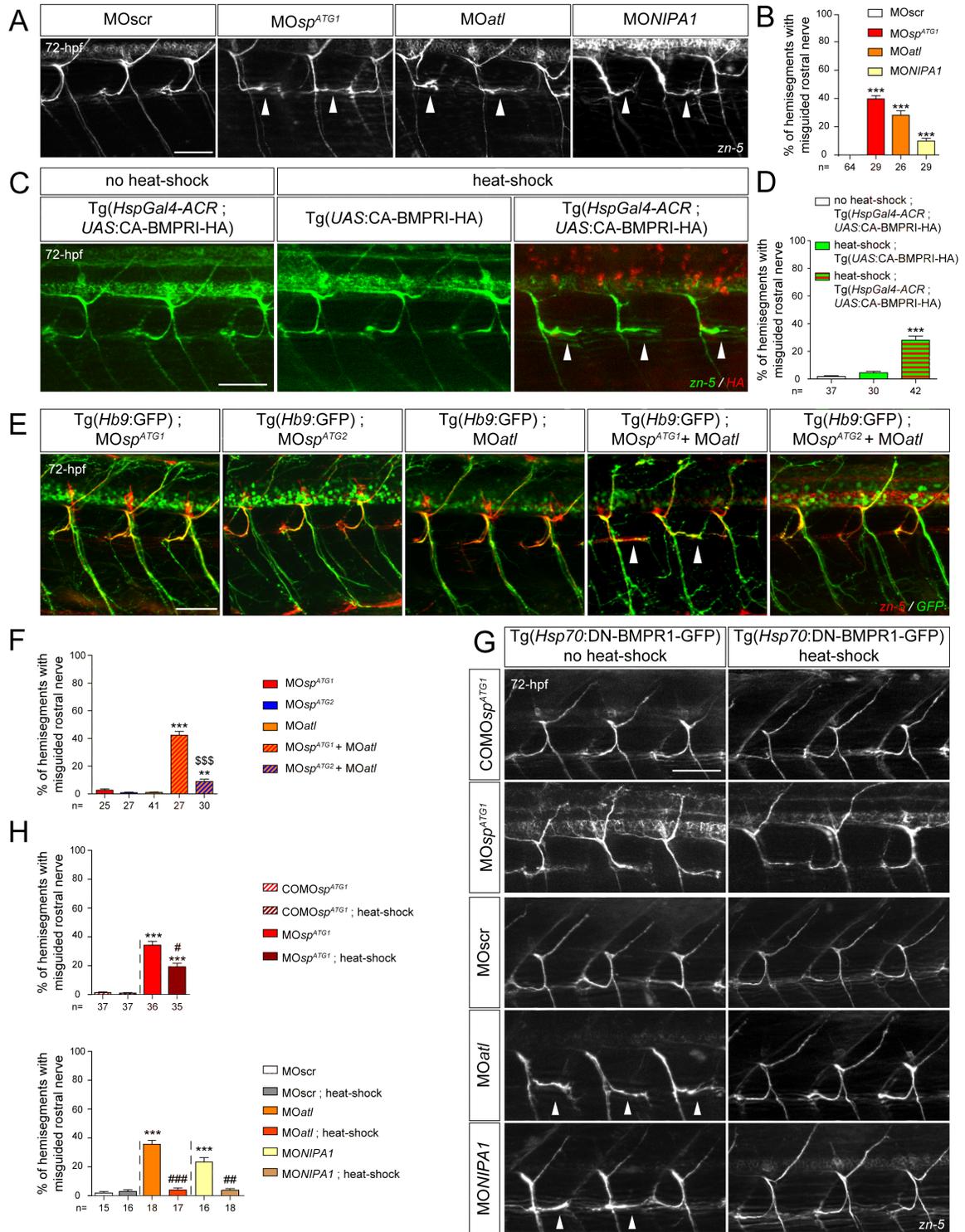
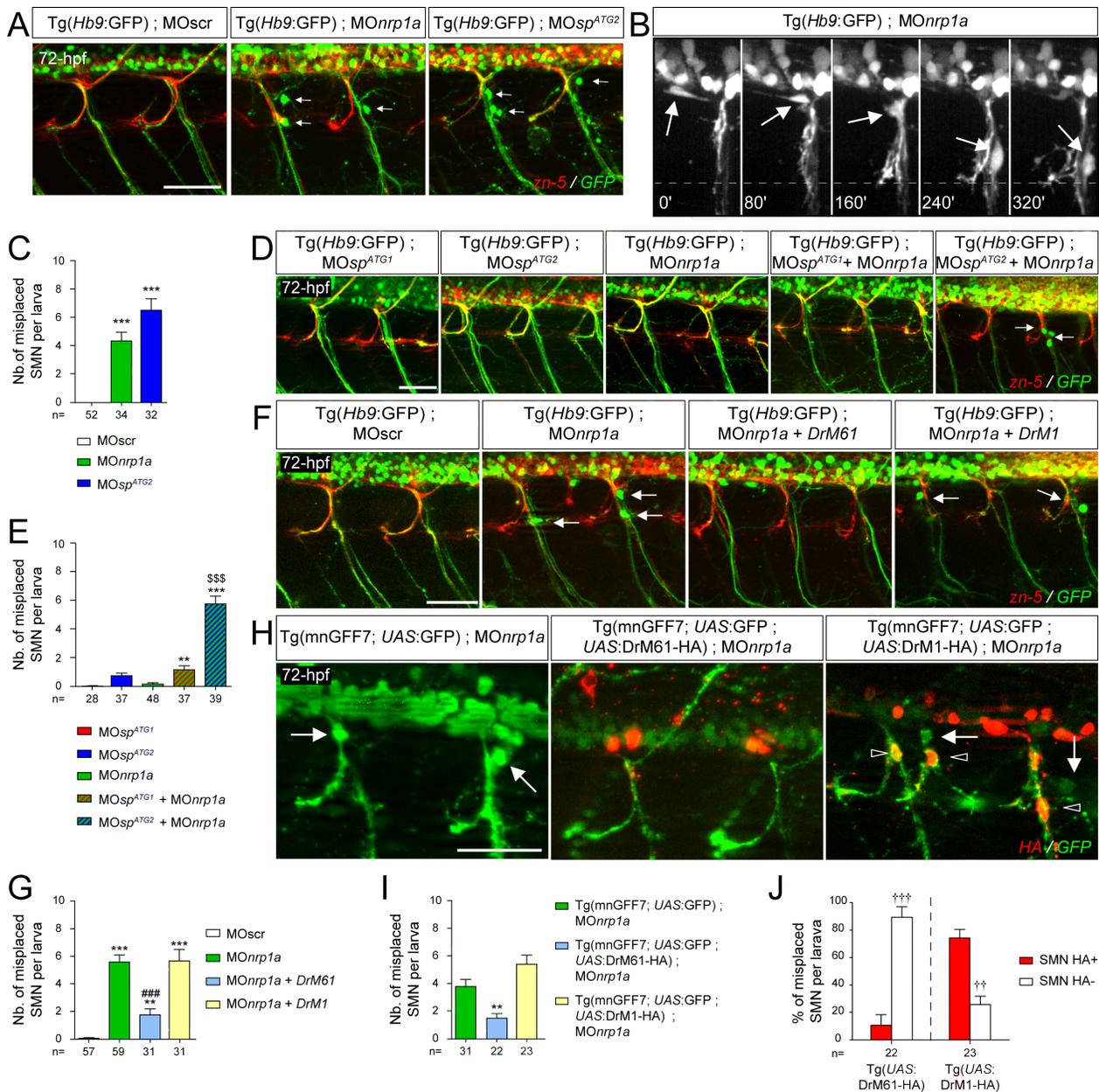


Figure 6: DrM61 acts as a downstream effector of Neuropilin-1a signalling in motor neurons.



Legends to Supplemental Materials

Supplemental Figure 1: *COMO_{sp}^{ATG1}* and *COMO_{sp}^{ATG2}* morpholinos do not alter zebrafish morphology, locomotion and SMN development.

(**A-B**) Overall morphology (A) and locomotor behaviour of 72-hpf larvae injected with *COMO_{sp}^{ATG1}* (n=51), *COMO_{sp}^{ATG2}* (n=51) or *MOscr* (n=51) morpholinos. (B) Tracking analysis of 72-hpf larvae injected with *COMO_{sp}^{ATG1}*, *COMO_{sp}^{ATG2}* or *MOscr* morpholinos. Each line represents the trajectory of one larva after touch stimulation. Dotted circle radius symbolizes the mean covered swimming distance. Scale bars: 1mm. (**C-D**) Quantification of the mean swimming covered distance (C) and speed (D). No statistical differences were observed between each group of larvae; Kruskal–Wallis ANOVA test with Dunn’s post test. Error bars are SEM. (**E**) Immunolabelling of sMN in 72-hpf Tg(*Hb9*:GFP) transgenic larvae injected with *COMO_{sp}^{ATG1}* (n=34), *COMO_{sp}^{ATG2}* (n=34) or *MOscr* (n=35) morpholinos using zn-5 and GFP antibodies. Lateral views of the trunk, anterior to the left. Scale bar: 50µm. Each group of larvae show normal SMN development.

Supplemental Figure 2: Overexpression M1, M1K or M87 does not affect the morphology, mobility and SMN development of control morpholino-injected larvae.

(**A, C-D**) Overexpression of M1 or M87 in *COMO_{sp}^{ATG2}* injected larvae. (**B, C-D**) Overexpression of M1 or M87 in *COMO_{sp}^{ATG1}* injected larvae. (**A, B; upper panels**) Immunolabelling of sMN in 72-hpf *COMO_{sp}^{ATG2}* (A) or *COMO_{sp}^{ATG1}* (B) Tg(*Hb9*:GFP) larvae overexpressing or not M1 or M87, using zn-5 and GFP antibodies. Lateral views of the trunk, anterior to the left. Scale bars: 50µm. Each group of larvae (at least 29 larvae per group) show normal SMN development. (**A, B; middle panels**) Overall morphology of 72-hpf *COMO_{sp}^{ATG2}* (A) or *COMO_{sp}^{ATG1}* (B) Tg(*Hb9*:GFP) larvae overexpressing or not M1 or M87. Scale bars: 1mm. (**A, B; bottom panels**) Tracking analysis of 72-hpf *COMO_{sp}^{ATG2}* (A) or *COMO_{sp}^{ATG1}* (B) Tg(*Hb9*:GFP) larvae overexpressing or not M1 or M87 in a touch-escape response test. Each line represents the trajectory of one larva after touch stimulation. Dotted circle radius symbolizes the mean swimming covered

distance. Scale bars: 1mm. **(C-D)** Quantifications of the mean swimming covered distance (C) and speed (D). N value for each larval group is indicated under the corresponding histogram bar. No statistical differences were observed between the different groups of larvae; Kruskal–Wallis ANOVA test with Dunn’s post test. Error bars are SEM.

Supplemental Figure 3: Specific involvement of DrM1 in the BMP signalling pathways.

(A) Co-injection of $COMO_{sp}^{ATG1}$ or $COMO_{sp}^{ATG2}$ control morpholinos with sub efficient doses of MO_{atl} morpholino does not perturb rostral nerve targeting. **(A)** Immunolabelling of sMN in 72-hpf larvae injected with low doses of $COMO_{sp}^{ATG1}$, $COMO_{sp}^{ATG2}$ or MO_{atl} morpholinos or co-injected with $COMO_{sp}^{ATG1}$ or $COMO_{sp}^{ATG2}$ and MO_{atl} morpholinos using zn-5 and GFP antibodies. Lateral views of the trunk, anterior to the left. Scale bars: $50\mu m$. Each group of larvae (at least 20 larvae per group) show normal SMN development. **(B-D)** Genetic inhibition of the BMP pathway does not improve the morphology and locomotor behaviour of ATG1 morphants. Overall morphology (B, upper panels) and tracking analysis (B, bottom panels) of non-heat-shocked or heat-shocked 72-hpf $Tg(Hsp70:DN-BMPRI-GFP)$ transgenic larvae injected with MO_{sp}^{ATG1} or $COMO_{sp}^{ATG1}$ morpholinos. **(E-J)** Genetic inhibition of the BMP pathway has no beneficial effect on ATG2 morphant phenotypes. **(E)** sMN analysis (left panels), overall morphology (upper right panels) and locomotor behaviour (lower right panels) of non-heat-shocked or heat-shocked 72-hpf $Tg(Hsp70:DN-BMPRI-GFP)$ transgenic larvae injected with MO_{sp}^{ATG2} or $COMO_{sp}^{ATG2}$ morpholinos. **(B, E)** Each line represents the trajectory of one larva after touch stimulation. Dotted circle radius symbolizes the mean swimming covered distance. **(B)** Arrows indicate the curved tail phenotype. **(E)** Arrowheads point out yolk tube agenesis; asterisks indicate smaller eyes. Scale bars: 1mm. **(C-D and I-J)** Quantifications of the mean swimming covered distance (C, I) and speed (D, J). N value for each larval group has been indicated under the corresponding histogram bar. *** $p \leq 0.001$ versus controls; Kruskal–Wallis ANOVA test with Dunn’s post test. **(E, left pan-**

els) Immunolabelling of sMN using zn-5 and GFP antibodies. Empty arrowheads and asterisks indicate missing rostral and dorsal nerves respectively. Arrows indicate misplaced sMN. Scale bar: $50\mu\text{m}$. **(F-H)** Quantifications of sMN defects (in 24 spinal hemisegments/larva). *** $p\leq 0.001$ versus COMO_{sp}^{ATG2} ; Kruskal–Wallis ANOVA test with Dunn’s post test. Error bars are SEM.

Supplemental Figure 4: Co-injection of COMO_{sp}^{ATG1} or COMO_{sp}^{ATG2} control morpholinos with sub efficient doses of MO_{nrp1a} morpholino does not affect SMN development.

Immunolabelling of sMN in 72-hpf larvae injected with low doses of COMO_{sp}^{ATG1} (n=28), COMO_{sp}^{ATG2} (n=37) or MO_{nrp1a} (n=48) morpholinos or co-injected with COMO_{sp}^{ATG1} (n=37) or COMO_{sp}^{ATG2} (n=39) and MO_{nrp1a} morpholinos using zn-5 and GFP antibodies. Lateral views of the trunk, anterior to the left. Scale bars: $50\mu\text{m}$. Each group of larvae shows normal SMN development.

Supplementary Video 1, A-D: ATG1 and ATG2 morphants show obvious and different locomotor deficits.

Monitoring of touch-evoked escape behaviours of 72-hpf larvae injected with MO_{sp}^{ATG1} (**Supplementary Video 1, A**), COMO_{sp}^{ATG1} (**Supplementary Video 1, B**), MO_{sp}^{ATG2} (**Supplementary Video 1, C**) and COMO_{sp}^{ATG2} (**Supplementary Video 1, D**).

Supplementary Video 2, A-C: Distinctive navigational behaviour of ATG1 and ATG2 morphant sMN axons at the choice point.

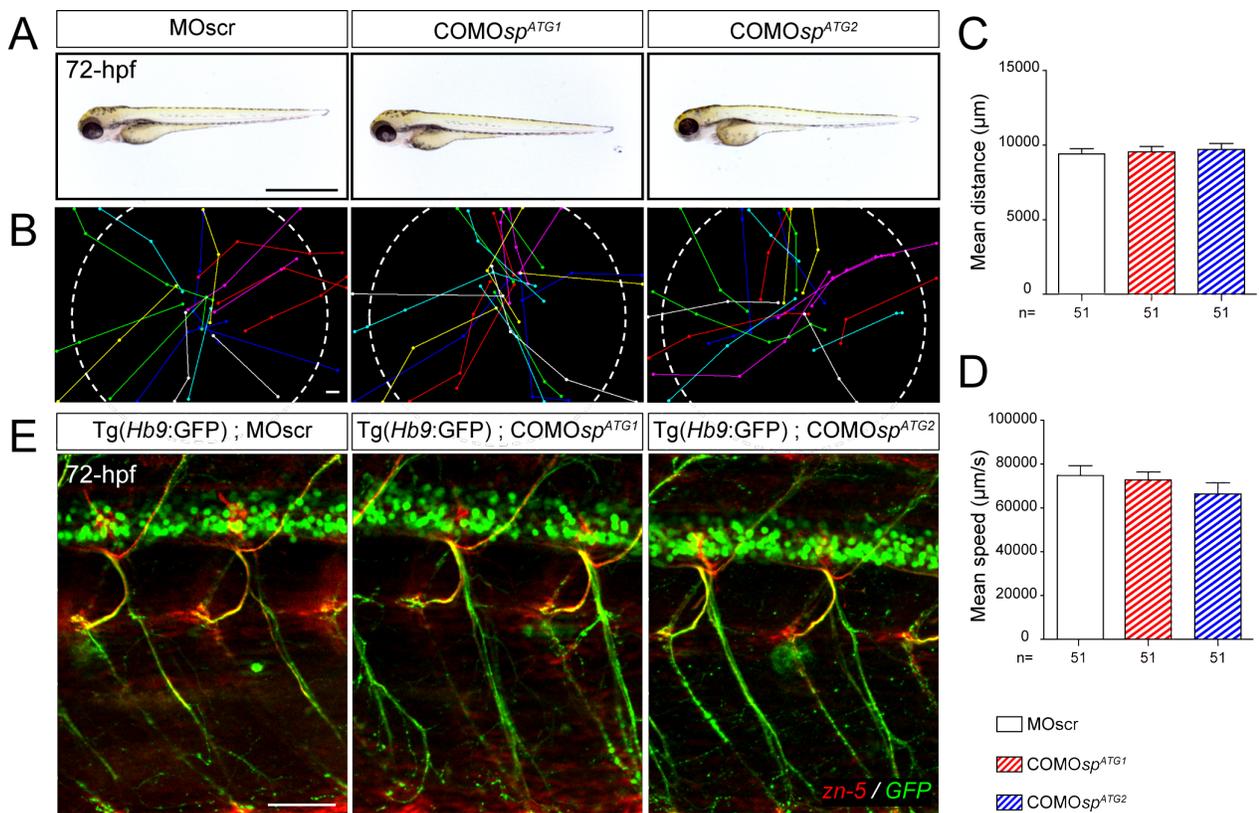
Time-lapse recording of sMN axon outgrowth in 40-72hpf Tg(*Hb9*:GFP) transgenic control (MO_{scr} , **Supplementary Video 2, A**), MO_{sp}^{ATG1} (**Supplementary Video 2, B**) and MO_{sp}^{ATG2} morphant (**Supplementary Video 2, C**) larvae using a spinning disk microscope. The white line indicates the horizontal myoseptum. Frames were taken every 8 minutes.

Supplementary Video 3: Navigational behaviour of *nrp1a* morphant sMN.

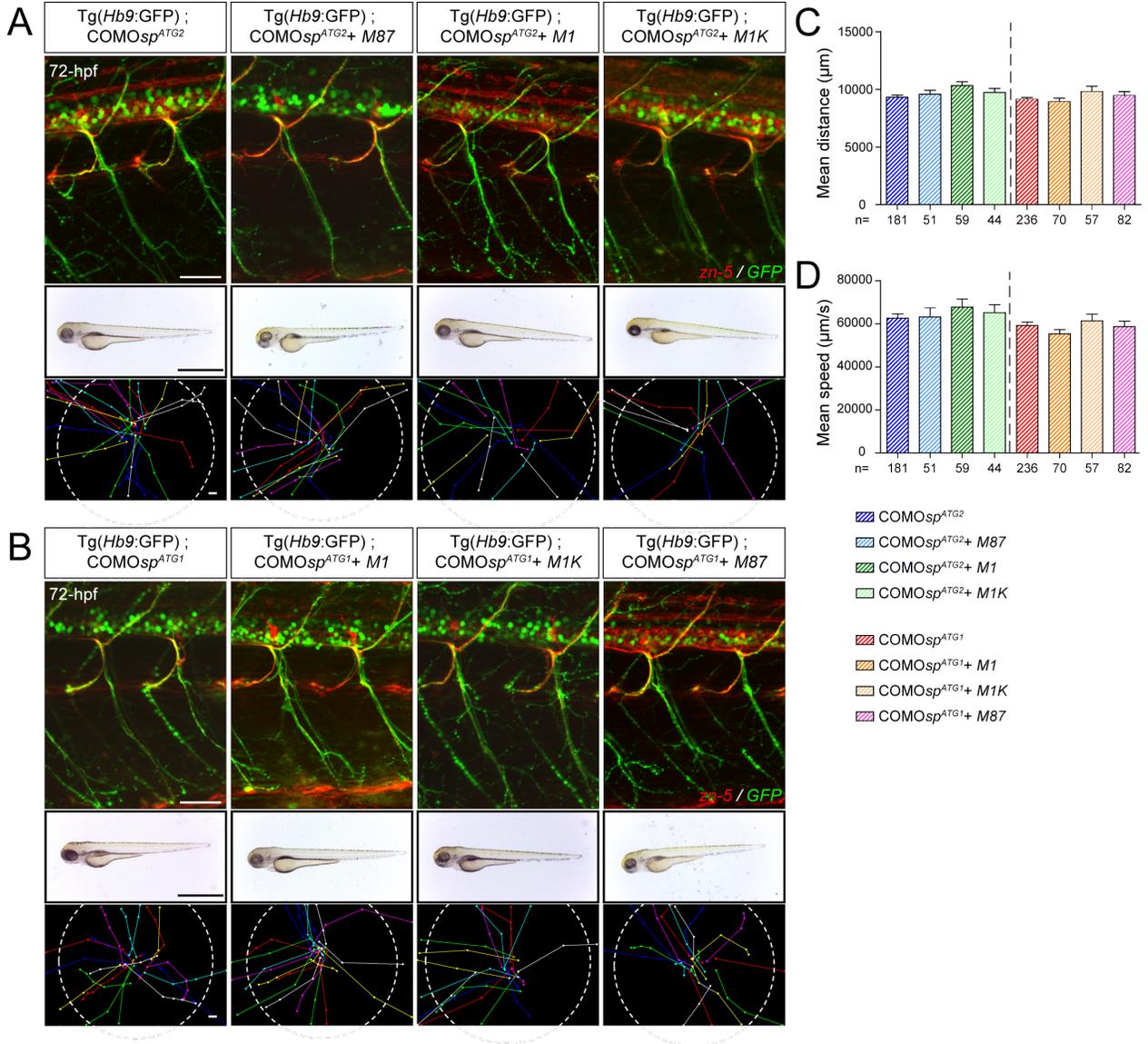
Time-lapse recording of sMN outgrowth in 40-72hpf Tg(*Hb9*:GFP) transgenic larvae injected with MO*nrp1a* using a spinning disk microscope. The white line indicates the horizontal myoseptum. Frames were taken every 8 minutes.

Supplemental Materials

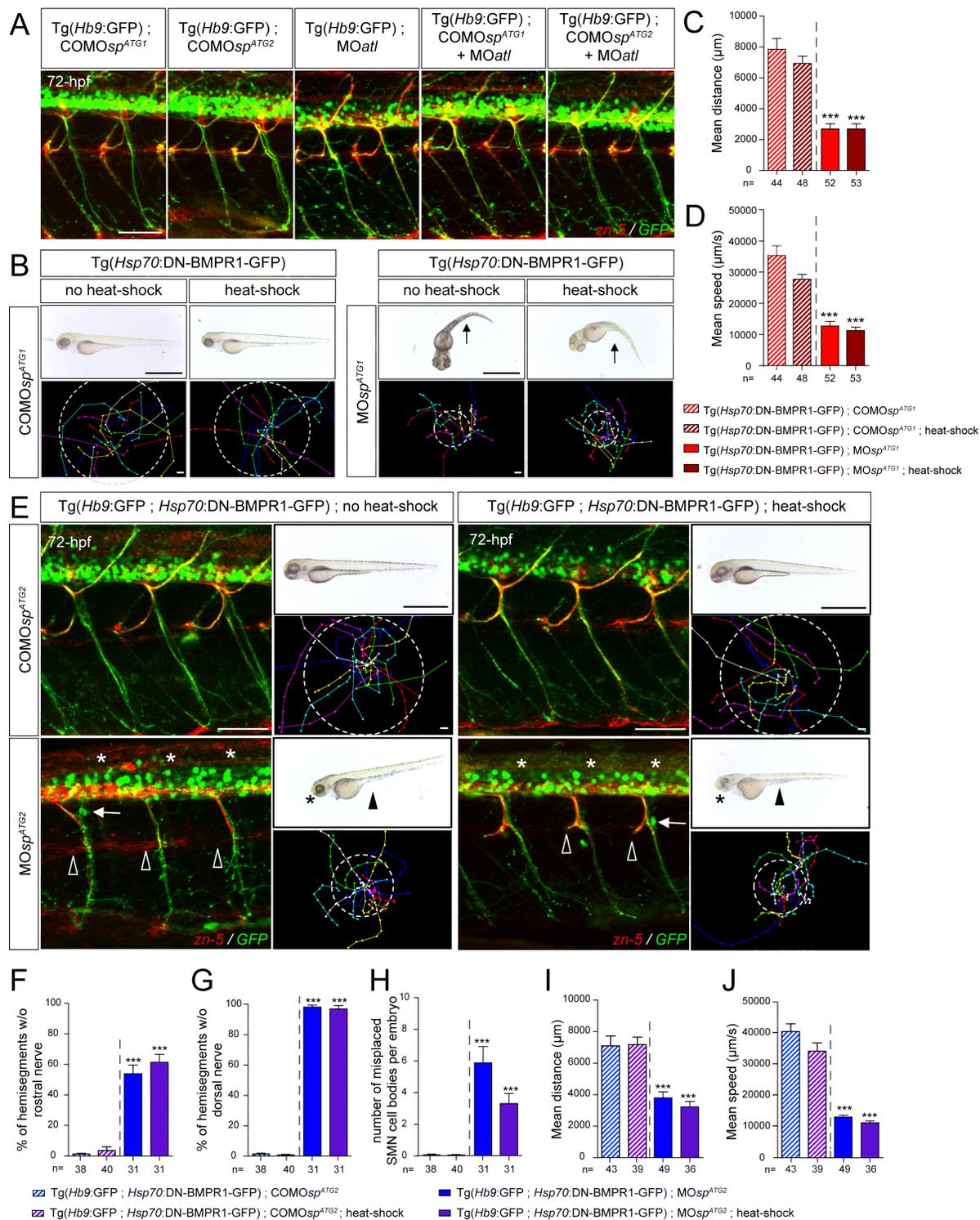
Supplemental Figure 1: COMO*sp*^{ATG1} and COMO*sp*^{ATG2} morpholinos do not alter zebrafish morphology, locomotion and SMN development.



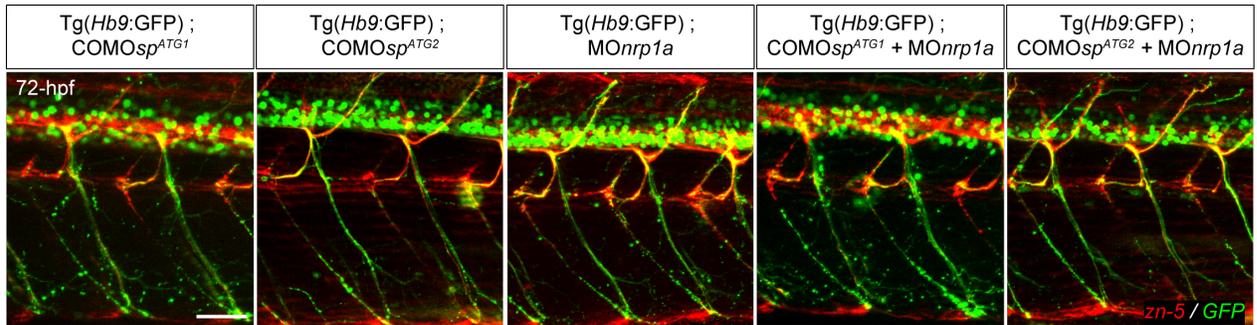
Supplemental Figure 2: Overexpression M1, M1K or M87 does not affect the morphology, mobility and SMN development of control morpholino-injected larvae.



Supplemental Figure 3: Specific involvement of DrM1 in the BMP signalling pathways.



Supplemental Figure 4: Co-injection of *COMO_{sp}^{ATG1}* or *COMO_{sp}^{ATG2}* control morpholinos with sub efficient doses of *MO_{nrrp1a}* morpholino does not affect SMN development.



Troisième partie

DISCUSSION

I Y a t-il une redondance fonctionnelle entre la spastin et la p60-katanin ?

(Article 1, Ten Martin et al., soumis)

La spastin et la p60-katanin, qui appartiennent au même sous-groupe dit « méiotique » d'ATPases, présentent des homologies significatives de séquence et de fonction. En effet, ces deux membres de la superfamille des AAA (pour ATPases Associées à Diverses Activités Cellulaires) sont deux enzymes de cassure des MTs, enrichies dans le système nerveux, qui se sont révélées essentielles à la croissance axonale de différentes populations de neurones tant *in vitro* qu'*in vivo* (Ahmad et al., 1999; Karabay et al., 2004; Wood et al., 2006; Riano et al., 2009; Butler et al., 2010; Vitriol and Zheng, 2012). Toutefois, la déplétion de l'une dans de neurones en culture ne semble pas être compensée par la présence de l'autre puisque des phénotypes cellulaires émergent après la perte de fonction de chacune d'entre elles (Ahmad et al., 1999; Karabay et al., 2004; Riano et al., 2009). En outre, l'haploinsuffisance de la spastin, qui semble être le mécanisme le plus fréquemment incriminé dans les PSH associées à des mutations dans le gène *SPG4*, n'est clairement pas contrebalancée par la présence de la p60-katanin dans les neurones corticaux. Il a été proposé que la p60-katanin ne pouvait pas compenser la fonction de la spastin à l'âge adulte, car l'expression de cette protéine samourai diminue considérablement après la naissance (Yu et al., 2005; Solowska et al., 2008). Cependant, il est à noter que les niveaux d'expression de la p60-katanin sont significativement plus élevés comparés aux contrôles dans des cellules souches induites de patients *SPG4* (Havlicek et al., 2014).

Au cours du développement, il semblerait qu'il n'y ait pas non plus de réelle redondance fonctionnelle entre ces deux protéines et que, bien que très similaires, la spastin et la p60-katanin aient des fonctions indépendantes, même quand elles agissent au sein d'un même processus cellulaire. Par exemple, lors de l'anaphase mitotique, la spastin stimule la dépolymérisation des MTs par la kinesin 13 à partir des bouts « - » en les libérant de leur ancrage au centrosome alors que la p60-katanin casse les MTs à partir de leurs bouts « + » pour cette fois les libérer de leur ancrage au kinétochore et les rendre ainsi accessible à cette même kinesin dépolymérisante (Zhang et al., 2007a). De plus, ces deux enzymes semblent participer différemment au développement neuritique. En effet, on note

Discussion

l'apparition de branches surnuméraires dans des neurones en culture surexprimant la spastin ce qui n'est pas observé lors de la surexpression de la p60-katanin (Figure 44 ; Yu *et al.*, 2008b). Il a été proposé que cette différence d'action entre ces deux MSE (pour Microtubule-Seaving Enzyme) pouvait être due à la « protection » du réseau axonal de MTs par la protéine stabilisatrice Tau : ainsi, la p60-katanin ne pourrait casser les MTs décorés par Tau alors que la spastin ne serait pas bloquée par la présence de cette MAP (pour Microtubule-Associated Protein) (Figure 44 ; Qiang *et al.*, 2006 ; Yu *et al.*, 2008b).

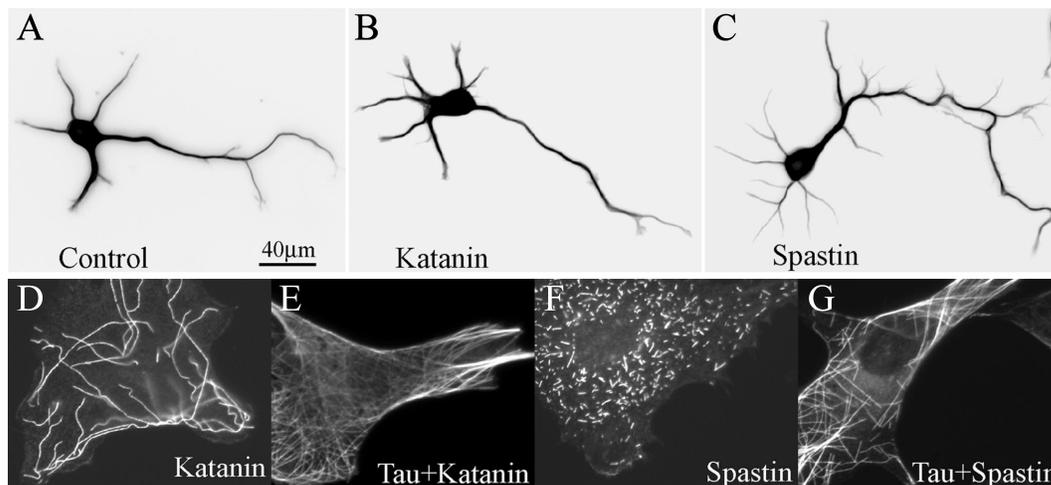


FIGURE 44 – **Les activités de cassure des microtubules portées par la spastin et la p60-katanin ne semblent pas redondantes.** (A-C) Seule la surexpression de la spastin dans des neurones entraîne une augmentation du nombre de branches. Neurones hippocampiques surexprimant EGFP (A), EGFP-p60-katanin (B) ou EGFP-spastin (C). (D-G) La protéine stabilisatrice tau protégerait les MTs de la cassure par la p60-katanin et n'aurait que peu d'effet sur l'activité de cassure de la spastin. Marquage de la tubulin dans des fibroblastes de rat exprimant la P60-katanin (D,E), la spastin (F,G) et la protéine tau (E,G). Modifié de Yu *et al.* 2008b.

Nos travaux chez des embryons de poisson-zèbre montrent que les défauts de l'architecture axonale des neurones moteurs spinaux suite à la perte de la p60-katanin ne peuvent être sauvegardés par la surexpression de la spastin, qu'elle soit ubiquitaire ou motoneurone-spécifique grâce à l'utilisation du système *UAS/GAL4* (Ten Martin *et al.*, Article 1). Ces résultats confirment donc les expériences de *knockdown* isolé de la spastin ou de la p60-katanin, qui ont toutes deux un impact sur le développement des motoneurones spinaux du téléoste, mais dont la perte de l'une n'est pas compensée

par la présence de l'autre dans ces neurones embryonnaires *in vivo* (Wood *et al.*, 2006; Butler *et al.*, 2010). Quels mécanismes *in* ou *ex vivo* pourraient expliquer les différences fonctionnelles de ces deux enzymes dont les activités *in vitro* sur des MTs polymérisés sur des lames de verre sont pourtant si proches ?

En plus de la présence de MAPs décorant les MTs qui peuvent influencer de façon différentielle leur activité sur le réseau de MTs, les modifications post-traductionnelles (ou MPT) de la tubulin, qui créent par ce biais différentes sous-populations de MTs, ont également un impact direct sur l'activité des protéines interagissant avec ces polymères. En ce sens, la queue C-terminale de la tubulin (ou CTT pour Carboxy-Terminal Tail) semble être déterminante pour la cassure des MTs par la spastin ou la katanin puisqu'un traitement à la subtilisin, dégradant cette CTT, confère aux MTs une résistance face à ces deux MSE (Roll-Mecak and Vale, 2005; Eckert *et al.*, 2012). Ainsi, les MPT que subit la queue C-terminale de la tubulin participent à la régulation de leur activité enzymatique. Par exemple, la polyglutamylation de la tubulin, qui avec l'acétylation marqueraient de façon prédominante les MTs au sein des neurones, jouerait un rôle crucial dans le développement du système nerveux (Audebert *et al.*, 1994; Janke and Kneussel, 2010; Janke and Bulinski, 2011).

En outre, il a été montré que la polyglutamylation influence l'activité de cassure de la spastin et probablement, mais dans une moindre mesure, celle de la p60-katanin (Lacroix *et al.*, 2010; Valenstein and Roll-Mecak, 2016). En effet, les MTs peuvent être 'marqués' par des chaînes latérales de résidus glutamates, de longueur variable, qu'ajoutent les enzymes de type Tubulin Tyrosine Ligase Like (ou TTLL ; van Dijk *et al.*, 2007). Dans des cellules non neuronales ou *in vitro*, il a été établi que l'addition de longues chaînes de glutamates par les enzymes TTLL6, 11 et 7 sur la queue C-terminale de la tubulin conféraient aux MTs une plus grande sensibilité à la cassure par la spastin et que l'activité de cette dernière était donc finement régulée par le degré de polyglutamylation engendré par ces TTLL (Lacroix *et al.*, 2010; Valenstein and Roll-Mecak, 2016). Chez l'embryon de poisson-zèbre, les transcrits codant les protéines TTLL6 et TTLL11 sont tous deux fortement enrichis dans le système nerveux embryonnaire, et en particulier dans la moelle épinière (Pathak *et al.*, 2011). Comme ces deux polyglutamylases, dont les activités étaient jusqu'ici indistinguables, modulent clairement l'activité de la spastin et que la polyglutamylation de la tubulin par TTLL6 semble générer l'accumulation

de la P60-katanin sur les MTs (Lacroix *et al.*, 2010), nous avons cherché à savoir quel(s) est/sont le(s) rôle(s) de ces TTLL et quels liens elles entretiennent avec nos deux MSE d'intérêt au cours du développement du système nerveux du poisson-zèbre. Nos travaux ont montré que la surexpression d'une et une seule de ces TTLL, TTLL6, permettait de sauvegarder les défauts de trajectoire axonale des motoneurones spinaux suite à la perte de fonction de la p60-katanin (Ten Martin *et al.*, Article 1). Nous avons donc pu compléter les travaux de Lacroix *et al.* (2010), en montrant que la p60-katanin, à l'image de la spastin, subit l'influence de la polyglutamylation par la TTLL6 *in vivo*. Notre étude établit également que cette MPT a un impact sur la navigation axonale des neurones moteurs spinaux et donc sur la formation des circuits moteurs, et ce, entre autres, via la régulation de l'activité de ces MSE. En outre, nous avons identifié une différence fonctionnelle entre ces deux polyglutamylases qui n'étaient pas différenciées dans la littérature jusqu'ici. En effet, non seulement la perte de TTLL6 n'engendre pas les mêmes défauts de croissance et de navigation axonales des motoneurones que le *knockdown* de TTLL11 mais, de plus, la surexpression de l'une ne peut compenser la perte de l'autre dans le développement des circuits moteurs, et réciproquement. Une question demeure : est-ce que la polyglutamylation par la TTLL6 accroît l'activité de la p60-katanin résiduelle dans le contexte du *knockdown* de cette MSE ou au contraire permet-elle d'activer anormalement la spastin à des « postes de travail » du neurone embryonnaire qu'occupe uniquement la p60-katanin en conditions physiologiques? Le traitement de cultures primaires de neurones hippocampiques de rat par le peptide amyloïde induit une accumulation anormale de la protéine tau dans les dendrites, qui, à son tour, stimule la cassure des MTs par la spastin, activée par l'invasion simultanée de la protéine TTLL6 et la polyglutamylation accrue des MTs dans ces dendrites (Zempel *et al.*, 2013). Ces données pourraient suggérer que le sauvetage par TTLL6 du phénotype axonal engendré par le *knockdown* de la p60-katanin serait dû à une désinhibition de l'activité de cassure de la spastin qui « succèderait » à sa grande sœur samouraï de MTs dans ce contexte.

Alternativement, la protéine tau, qui protège les MTs de la cassure par la p60-katanin (Qiang *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2008b), présente une affinité variable pour les MTs selon le degré de polyglutamylation de ces polymères (Boucher *et al.*, 1994). En effet, l'ajout de 1 à 3 résidus glutamate(s) sur la queue C-terminale de la tubulin stimule l'interaction entre Tau et les MTs, qui est au contraire

inhibée si la chaîne de glutamates est composée de plus de 4 à 5 résidus (Boucher *et al.*, 1994). Or les polyglutamylases de type TLL6 et 11 sont plus clairement impliquées dans l'élongation des chaînes de glutamates sur la queue CTT de la tubulin que dans l'initiation du processus de glutamylation comme l'est TLL7 (van Dijk *et al.*, 2007). Or même TLL7 est capable d'ajouter des chaînes de glutamates de différentes longueur *in vitro* (supérieure ou égale à 8 Glu) et cette variabilité de taille des chaînes influe directement, et à quelques résidus glutamates près, sur l'activité de cassure des MTs exercée par la spastin (Valenstein and Roll-Mecak, 2016). Au vu de nos résultats, on pourrait donc faire l'hypothèse, que dans les neurones moteurs spinaux de poisson-zèbre, l'enzyme TLL6 ajoute une chaîne conséquente de glutamates mais d'une longueur différente à celle qu'ajoute TLL11, et que cette chaîne de glutamates, potentiellement supérieure à 3 résidus, pourrait perturber l'interaction de Tau avec les MTs (Boucher *et al.*, 1994), et *booster* ainsi l'activité résiduelle de la p60-katanin après *knockdown*, sans impliquer sa protéine sœur, la spastin. Enfin, la différence fonctionnelle observée *in vivo* entre les deux polyglutamylases à longues chaînes, TLL6 et TLL11, pourrait être également expliquée par l'ajout de chaînes de glutamates à des positions différentes sur la queue C-terminale de la tubulin, ce qui, couplé à des longueurs de chaînes variables, permettraient une régulation fine et complexe de l'activité de cassure exercée par la p60-katanin ou la spastin.

Dans cette étude, nous avons donc établi que ces deux enzymes de cassure des MTs ont un impact distinct sur la croissance et surtout la navigation des axones des motoneurones spinaux, et avons mis à jour le rôle de la polyglutamylation de la tubulin dans la formation des circuits moteurs. Notre travail révèle donc le deuxième exemple de modifications post-traductionnelles (MPT) de la tubulin, avec le phénomène de tyrosination/détyrosination du dernier résidu de la queue C-terminale de l' α -tubulin, qui participent à des processus de croissance et de navigation axonales au cours du développement des circuits neuronaux (Erck *et al.*, 2005; Marcos *et al.*, 2009). Une troisième MPT des MTs, l'acétylation de la tubulin, est très abondamment enrichie dans les neurones embryonnaires et en particulier dans les axones en croissance ou matures (Janke and Kneussel, 2010). Or, l'acétylation de la tubulin a également un impact sur l'activité de cassure des MTs exercée par la p60-katanin. En effet, dans des fibroblastes et des neurones de rat en culture, l'inhibition de l'histone déacétylase 6

(HDAC6) entraîne une augmentation de l'acétylation des MTs, ce qui a pour effet de favoriser la cassure de ces polymères acétylés par la p60-katanin mais n'a que peu d'effet sur l'activité de sa petite sœur, la spastin (Sudo and Baas, 2010). Parallèlement, des mutations nulles de la p60-katanin chez *Tetrahymena* provoque une augmentation massive du taux de MTs acétylés (Sharma *et al.*, 2007) et réciproquement, la surexpression de la déacétylase HDAC6 chez la drosophile permet de sauver le phénotype des jonctions neuromusculaires (i.e., un excès de boutons synaptiques) associé à la surexpression de la p60-katanin (Mao *et al.*, 2014). Toutefois, comme HDAC6 contrôle également l'acétylation d'autres substrats susceptibles d'influencer le réseau de MTs, comme la cortactin (Zhang *et al.*, 2007b), il serait intéressant d'étudier l'éventuelle implication de l'acétylation des MTs dans la formation des circuits moteurs d'embryons de poisson-zèbre, sauvages ou déplétés en p60-katanin, et ce via la modulation de l'expression de la tubulin acetyl transferase α TAT1 (ou MEC-17; Akella *et al.*, 2010).

II Un rôle différentiel pour les deux isoformes majoritaires de la spastin

(Article 2, Jardin *et al.*, soumis)

S'il est clair aujourd'hui que la régulation de la dynamique des MTs assurée par la spastin est cruciale pour le développement et l'homéostasie des circuits moteurs, son implication dans de nombreux processus cellulaires rend plus ardue la compréhension des mécanismes pathogéniques à l'origine des PSH liées au gène *SPG4*. Cependant, la synthèse de deux isoformes majoritaires par l'utilisation alternative de deux codons initiateurs de la traduction (ATG1 et ATG2) sur le transcrite *SPG4* suggère que la spastin puisse « répartir » ses multiples fonctions entre ses différentes formes (Claudiani *et al.*, 2005). Depuis la découverte des deux isoformes longue (ou M1) et courte (ou M87) de la spastin (Claudiani *et al.*, 2005), certaines études ont cherché à déterminer le(s) rôle(s) spécifique(s) de chacune d'entre elles, via l'identification de leurs partenaires d'interaction, ce qui pouvait suggérer leur localisation subcellulaire. D'autres analyses ont consisté à surexprimer dans des cellules en culture l'une ou l'autre de ses deux isoformes, en utilisant des constructions d'ADNc de *SPG4*, mutées sur

l'ATG2 (expression spécifique de l'isoforme longue, M1), sur l'ATG1 ou des constructions débutant à l'ATG2 (expression sélective de l'isoforme courte, M87). Toutefois, aucune étude n'a étudié les conséquences de la perte de fonction spécifique de l'une ou de l'autre des isoformes majeures de la spastin à ce jour.

Des différences en matière de domaines structuraux, partenaires d'interaction et localisation sub-cellulaire (Claudiani *et al.*, 2005; Sanderson *et al.*, 2006; Connell *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2010; Papadopoulos *et al.*, 2015) ont jusqu'ici suggéré une implication prédominante de l'isoforme longue (M1) dans la pathogénèse de cette maladie. En effet, l'isoforme M1, bien que minoritaire en niveau d'expression, est plus particulièrement enrichie dans le système nerveux dans son ensemble, y compris chez l'adulte (Claudiani *et al.*, 2005; Solowska *et al.*, 2008). En outre, les 86 acides aminés N-terminaux spécifiques à la séquence de M1 lui confèrent la possibilité d'interagir sélectivement avec des partenaires dont certains sont impliqués dans d'autres formes de PSH, comme atlastin-1, REEP1 et reticulon 2 (Sanderson *et al.*, 2006; Evans *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2010; Montenegro *et al.*, 2012).

Cependant, les expériences de surexpression des différentes formes de la spastin présentent certains inconvénients pour l'identification de leur(s) fonction(s) physiologique(s) sachant que les niveaux d'expression de chaque isoforme sont finement régulés au cours du temps et en fonction des différentes populations de neurones pour maintenir un rapport bien défini, principalement en faveur de l'isoforme courte (Claudiani *et al.*, 2005). Par exemple, la surexpression d'isoformes porteuses d'une mutation ponctuelle (M1_C448Y et M87_C448Y) ou tronquées (M1_STOP et M87_STOP) dans des neurones de rat en culture a pu conduire à des conclusions discutables quant à la cytotoxicité de l'isoforme longue mutée et à l'implication exclusive de M1 dans la pathogénèse des PSH (Solowska *et al.*, 2008). En effet, les niveaux massifs de protéines surexprimées ne sont en rien comparables aux taux d'expression endogènes de chacune de ces isoformes. Et, il en va de même pour une seconde étude du même groupe qui montre des défauts de croissance neuritique consécutifs à la seule surexpression de M1_C448Y dans des neurones en culture ainsi qu'un déficit locomoteur chez des drosophiles transgéniques surexprimant cette même isoforme longue mutée (Solowska *et al.*, 2014).

Les différences de niveaux entre le taux de M1 endogène et celui engendré par la surexpression de M1_C448Y ou M1_STOP proscrivent toute comparaison entre ces modèles cellulaires ou animaux et les mécanismes pathogéniques impliqués chez les patients porteurs de mutations à l'état hétérozygote.

C'est pourquoi nous avons cherché à déterminer la contribution spécifique de chaque isoforme de la spastin dans la pathogénèse des PSH liées au gène *SPG4* en réalisant une analyse comparative de leur fonction au cours du développement des circuits moteurs du poisson-zèbre. Dans ce but, nous avons ciblé les deux sites d'initiation de la traduction (ATG1 et ATG2) à l'aide d'oligonucléotides antisens ou morpholinos, après avoir mis en évidence que ces deux ATG étaient bien fonctionnels lors du développement de ce téléosté. Ces morpholinos nous ont permis, d'une part, de bloquer sélectivement le deuxième codon initiateur (ATG2), conduisant à la seule expression de l'isoforme longue chez les morphants dits ATG2, et d'autre part, d'inhiber la quasi-totalité de la production de l'isoforme longue tout en bloquant une partie de l'expression de la forme courte chez les morphants ATG1. Ainsi, contrairement au morpholino dirigé contre ATG1 qui diminue partiellement la traduction à partir de l'ATG2, le morpholino dirigé contre l'ATG2 ne pouvait perturber l'initiation de la traduction à partir de l'ATG1 dans la mesure où un morpholino ne montre aucune efficacité s'il s'apparie au-delà d'une vingtaine de paire de bases en aval du codon initiateur ciblé (Nasevicius and Ekker, 2000). L'usage des morpholinos, assez décriés ces dernières années pour leurs effets aspécifiques (ou « *off-target* », Kok *et al.*, 2015), couplé à des expériences de sauvetage appropriées et à l'usage concomitant de morpholinos contrôles nous ont permis d'appréhender la fonction de ces isoformes *in vivo* chez un modèle vertébré par l'analyse des phénotypes de perte de fonction. Cette approche, fondée sur l'usage des morpholinos s'est ainsi révélée efficace pour réaliser le *knockdown* de chacune de ces isoformes codées par un unique transcrit, contrairement aux stratégies d'ARN interférence utilisant les si- ou sh-RNA qui, en grande majorité, conduisent à la dégradation du transcrit ciblé (Summerton, 1999).

Nous avons ainsi pu montrer que les deux isoformes majoritaires de la spastin chez le poisson-zèbre (notées DrM1 pour *Danio rerio* M1, et DrM61, l'équivalent de la M87 chez l'homme ou la M85 chez les rongeurs) participaient différemment à la formation des circuits moteurs de la moelle. En effet, la déplétion de l'une ou de l'autre de ces isoformes conduit à des défauts de navigation axonale

des neurones moteurs spinaux distincts, ce qui entraîne différents déficits locomoteurs, spécifiques de la perte majoritaire de l'isoforme longue ou de celle de la courte. De plus, nos expériences de sauvetage croisé des phénotypes causés par le *knockdown* d'une de ces isoformes par l'autre ont révélé l'absence de redondance fonctionnelle entre ces deux isoformes de la spastin, ce qui souligne à nouveau leur spécificité fonctionnelle. Nos travaux nous ont également permis de mettre en évidence l'implication de DrM1 et de DrM61 dans deux voies de signalisation moléculaire distinctes : (i) l'isoforme DrM1 serait impliquée dans le développement des motoneurones via son rôle régulateur de la voie des BMP de concert avec d'autres protéines de PSH comme l'atlastin-1 et NIPA1 ; et (ii) nous avons identifié un rôle inédit et spécifique de DrM61 dans la migration neuronale et le navigation axonale en lien avec la signalisation du récepteur Neuropilin-1. Nos résultats suggèrent donc que les isoformes majeures de la spastin, M1 et M87, pourraient toutes deux contribuer de manière différente mais simultanée à la pathogénèse des PSH. En effet, si DrM1/M1 conserve sa place de coupable idéal en lien avec la voie moléculaire des BMP la plus fréquemment incriminée dans les PSH, avec pas moins de six formes concernées à ce jour (*SPG3A/atlastin-1*, Fassier *et al.*, 2010 ; *SPG4/spastin M1*, Tsang *et al.*, 2009 & nos travaux ; *SPG6/NIPA1*, Wang *et al.*, 2007 & Tsang *et al.*, 2009 ; *SPG20/spartin*, Renvoisé *et al.*, 2012 & Nahm *et al.*, 2013 ; *SPG39/Pnpla6*, Song *et al.*, 2013 ; et *SPG42/SLC33A1*, Mao *et al.*, 2015), nous allons voir ci-dessous que la voie induite par la fixation des ligands semaphorins sur les récepteurs neuropilin-1 n'en est pas moins importante pour le développement et l'homéostasie des faisceaux cortico-spinaux.

Dans nos deux études fonctionnelles de deux gènes de PSH (Fassier *et al.*, 2010 ; Jardin *et al.*, soumis), le poisson-zèbre a été un modèle idéal pour identifier les voies moléculaires dans lesquelles nos protéines d'intérêt, l'atlastin-1 et la spastin, s'intégraient. Les avantages évidents de ce modèle vertébré, abondamment décrits dans la littérature, comme la conservation fonctionnelle de son génome et protéome au cours de l'évolution, mais également la similarité des mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans le développement du système nerveux (Babin *et al.*, 2014), ainsi que la transparence de ses embryons et larves permettant le suivi de processus cellulaires et développementaux *in vivo*, lui confèrent une place de choix dans le Panthéon des modèles animaux. Toutefois, afin de se rapprocher de la physiopathologie des PSH, il est important d'observer la contribution

de ces voies de signalisation au phénotype cellulaire décrit chez les patients et reproduit dans des modèles de cellules souches induites ou chez un modèles de mammifères, telles que les souris *knockout* (KO) pour le gène *SPG4* (Tarrade *et al.*, 2006; Kasher *et al.*, 2009; Denton *et al.*, 2014; Havlicek *et al.*, 2014). La suite de mon travail impliquera donc l'utilisation de neurones corticaux issus d'embryons de souris KO *SPG4* en culture primaire, afin de confirmer l'importance de ces deux voies de signalisation, BMP et Semaphorin/Neuropilin-1, dans l'apparition du phénotype princeps de ces neurones, les dilatations axonales (Tarrade *et al.*, 2006; Kasher *et al.*, 2009; Fassier *et al.*, 2013), et par le biais de test d'effondrement (collapse) des cônes de croissance de ces neurones en réponse à ces molécules de signalisation (Figure 45). En outre, dans le but d'affiner nos analyses chez le poisson, nous avons généré deux lignées transgéniques porteuses de mutations tronquantes localisées après le premier ATG (et donc potentiellement mutée pour l'isoforme longue exclusivement), ou juste en aval de l'ATG2 (mutant nul pour les deux isoformes de la Spastin) par la technique de CRISPR/Cas9 qui nous permettront d'étudier l'impact de ces mutations sur le développement mais également l'homéostasie des circuits moteurs chez le poisson adulte (Figure 45). De plus, il serait intéressant de déterminer si la mutation tronquante située entre les deux codons ATG chez l'homme (p.51fs1X; Proukakis *et al.*, 2003) permet toujours l'expression de l'isoforme courte comme cela avait été suggéré précédemment (Claudiani *et al.*, 2005), ce qui renforcerait les arguments en faveur de l'implication de la forme longue et donc de la voie des BMP dans la pathogénèse des PSH.

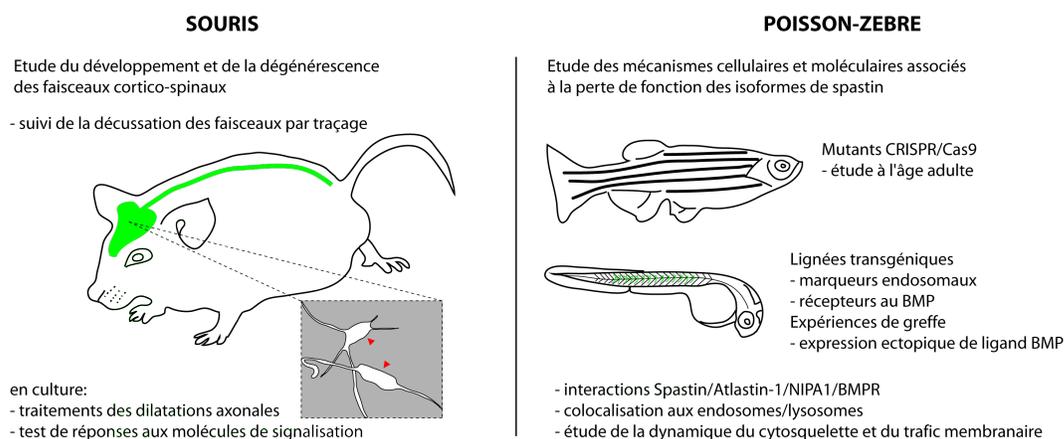


FIGURE 45 – Contribution respective des modèles souris et poisson-zèbre à l'analyse des voies de signalisation dérégulées par les isoformes DrM1/M1 ou DrM61/M87 dans le développement et la dégénérescence des circuits moteurs.

III L'isoforme courte en tant qu'effecteur de la signalisation Semaphorin/Neuropilin-1

Si l'isoforme longue de la spastin demeurait le suspect privilégié dans la pathogénèse des formes de PSH liées au locus *SPG4*, certains arguments dans la littérature nous laissaient entrevoir qu'une altération spécifique de l'isoforme courte pouvait être aussi délétère pour l'homéostasie des faisceaux nerveux affectés. En effet, il existe des variants intragéniques comme S44L et P45Q (Svenson *et al.*, 2004; Schickel *et al.*, 2007), qui engendrent une avancée de l'âge d'apparition de la maladie couplée à l'aggravation des symptômes des patients porteurs d'une mutation dans le gène *SPG4*. Ces variants « modificateurs » sont positionnés dans la séquence primaire de l'isoforme longue, au sein d'une région (acides aminés 23-45) comprenant à la fois un motif PEST nécessaire à la dégradation de l'isoforme M1 (Schickel *et al.*, 2007) et un promoteur cryptique permettant l'expression de l'isoforme M87 (Mancuso and Rugarli, 2008). Deux hypothèses quant au rôle délétère de ces polymorphismes ont été avancées, et toutes deux soulignent l'importance de l'isoforme courte, jusqu'alors négligée, dans la pathogénèse des PSH. (i) Ces polymorphismes pourraient en perturbant le signal induit par le motif PEST stabiliser l'isoforme longue (Schickel *et al.*, 2007). (ii) Dans le même ordre d'idée, une altération du promoteur cryptique permettant l'expression massive de l'isoforme courte pourrait réduire le taux de M87 en comparaison du niveau endogène normal de M1, ce qui perturberait le ratio entre ces deux isoformes (Mancuso and Rugarli, 2008). Ces variants aggravant le phénotype des patients *SPG4* pourraient donc indirectement modifier la composition des hexamères de spastin, dont l'oligomérisation est nécessaire au bon fonctionnement de cette enzyme (Ogura and Wilkinson, 2001; Roll-Mecak and Vale, 2008), en stabilisant anormalement l'isoforme M1 et en bloquant partiellement l'expression de M87. Au vu du ratio physiologique d'expression de M1/M87, toujours très déséquilibré en faveur de l'isoforme courte, la spécificité de cette isoforme pourrait donc résider dans la formation d'hexamères constitués exclusivement de M87, qui ne seraient pas soumis aux mêmes interactions protéiques et de ce fait pas adressés aux mêmes compartiments cellulaires que les hexamères mixtes

composés des deux isoformes M1 et M87. On pourrait donc supposer que ces hexamères (M87)₆ seraient au vu des niveaux d'expression de M87 principalement affectés par l'haploinsuffisance de la spastin, liée à la grande majorité des mutations de *SPG4*, ainsi qu'aux variants modificateurs de type S44L et P45Q.

Notre étude comparative de ces deux isoformes majeures de la spastin au cours du développement du poisson-zèbre suggère également que l'isoforme courte par son lien avec la signalisation Semaphorin/Neuropilin-1 pourrait également jouer un rôle clé dans la formation et la maintenance des faisceaux cortico-spinaux chez l'homme. En effet, dans l'une des nombreuses formes génétiques de PSH liée au locus *SPG1* sur le chromosome X, le gène responsable de la maladie code la molécule d'adhérence L1CAM (Jouet *et al.*, 1994), dont une étude ultérieure a pu montrer qu'elle était un corécepteur avec Neuropilin-1 (Nrp1) du ligand Semaphorin3A (Sema3A) et que l'interaction de Sema3A avec ces deux récepteurs Nrp1/L1-CAM était nécessaire à la décussation des faisceaux cortico-spinaux au cours du développement embryonnaire de la souris (Castellani *et al.*, 2000). En outre, la signalisation Sema3A/Nrp1 a été également impliquée dans deux autres maladies neurodégénératives affectant le système moteur : une neuropathie de Charcot-Marie Tooth de type 2 (CMT2D) et la forme familiale la plus fréquente de sclérose latérale amyotrophique associée à des mutations dans le gène *SOD1* (Venkova *et al.*, 2014; He *et al.*, 2015). D'une part, le gène *GARS*, responsable de la neuropathie de type CMT2D, code une Glycyl-tRNA synthetase (GlyRS) qui se lie anormalement au récepteur Nrp1 et entre en compétition avec l'un de ses ligands clés, VEGF (pour Vascular Endothelial Growth Factor; He *et al.*, 2015). D'autre part, les anomalies des jonctions neuromusculaires et le déficit locomoteur des souris mutantes *SOD1*^{G39A} sont significativement améliorés par une injection intrapéritonéale de l'anticorps ciblant le site de liaison entre Nrp1 et Sema3A (Venkova *et al.*, 2014). Ces deux études, couplées au lien précédemment décrit entre la forme *SPG1* de PSH et à notre étude fonctionnelle des isoformes de la spastin, confirment l'implication de cette signalisation Sema3A/Nrp1 dans différentes neuropathies affectant le développement et le maintien des neurones moteurs.

Chez le poisson-zèbre, les neurones moteurs spinaux (NMS) expriment les deux récepteurs de Sema3A : PlexinA3 et Nrp1a (Feldner *et al.*, 2005; Palaisa and Granato, 2007), alors que les deux orthologues de Sema3A chez le téléosté sont exprimés aux extrémités dorsale et ventrale du myotome pour Sema3A1 et dans la partie caudale de chaque somite pour sema3A2 (Feldner *et al.*, 2005). La trajectoire axonale de ces NMS ainsi que la position de leur corps cellulaire au sein de la moelle épinière est dépendante de la sécrétion des Sema3A par le myotome, ainsi que de leur interaction avec leur récepteur Nrp1a à la membrane des NMS (Sato-Maeda *et al.*, 2006, 2008). En effet, le *knockdown* de Nrp1a entraîne une sortie anormale des corps cellulaires des NMS dans la périphérie et hors de la moelle, le long de leurs faisceaux d'axones, impliquant que le signal Sema3A est requis pour restreindre le positionnement des soma des NMS à la moelle épinière (Feldner *et al.*, 2005). Dans notre caractérisation fonctionnelle de l'isoforme courte DrM61 de la Spastin, nous avons confirmé la notion d'autonomie cellulaire pour le récepteur Nrp1a puisque les défauts de migration des corps cellulaires des NMS associé à la perte de fonction de Nrp1a peuvent être restaurés par la surexpression exclusive de l'isoforme courte dans les NMS.

Comment expliquer le rôle de cette isoforme courte de la spastin dans la signalisation Sema3A/Nrp1 ? De façon intéressante, il a été révélé récemment que la protéine CRMP2 (pour Collapsin Response Mediator Protein-2) joue un rôle important dans le positionnement des corps cellulaires des NMS chez le poisson-zèbre, et ce, via sa phosphorylation par cdk5 (Morimura *et al.*, 2013). De plus, CRMP2 agit en aval de la voie Sema3A/Nrp1, dans la mesure où son inhibition par l'addition d'anticorps sur des neurones en culture abolit l'effondrement des cônes de croissance, normalement induit par la présence de Sema3A (Goshima *et al.*, 1995). Enfin, CRMP2 possède une affinité pour les dimères de tubulin qui lui confère la capacité d'assembler les microtubules. Or, la phosphorylation de CRMP2 par cdk5 altère la liaison de CRMP2 à la tubulin, ce qui perturbe la croissance axonale et la formation de branches dans des cultures primaires de neurones (Fukata *et al.*, 2002; Uchida *et al.*, 2005). De plus, comme la perte de fonction de CRMP2 chez le poisson-zèbre entraîne un phénotype très semblable à celui observé chez nos larves déplétées pour l'isoforme courte de la Spastin, on pourrait formuler l'hypothèse que l'isoforme DrM61/M87 agit en aval de la signalisation Nrp1a/Sema3A par un remodelage des microtubules réalisé de concert avec CRMP2.

Comment démontrer par la suite l'implication de la voie Nrp1a/Sema3A dans les PSH liées à des mutations du gène de la spastin ? Les souris mutantes pour la protéine L1-CAM, impliquée dans une forme rare de PSH (*SPG1*) présentent une hypoplasie des voies cortico-spinales, due à la « mauvaise » décussation de ces faisceaux qui ne traversent plus la ligne médiane (ou midline) pour se projeter du côté controlatéral et constituer les faisceaux pyramidaux croisés (Jouet *et al.*, 1994; Cohen *et al.*, 1998). Dans la suite de notre étude, nous étudierons en détail le développement des faisceaux cortico-spinaux chez les souris *knockout SPG4* avec une attention toute particulière sur la décussation des faisceaux pyramidaux. Dans ce but, nous réaliserons un traçage antérograde des axones de ces faisceaux à l'aide de l'injection d'un marqueur de type carbocyanine, Dextran, DiI ou PKH-26 (Kawaguchi *et al.*, 2010) dans le cortex moteur de l'hémisphère cérébral. Par ailleurs, nous chercherons à savoir si les neurones corticaux des souris *knockout SPG4* (Tarrade *et al.*, 2006) répondent correctement au signal induit par l'interaction entre Sema3A et son récepteur Nrp1, à l'aide d'une expérience d'effondrement (collapse) du cône de croissance. En effet, les différents compartiments des neurones corticaux embryonnaires répondent de manière opposée aux signaux des Semaphorins : les dendrites sont « attirées » tandis que les axones sont repoussés par Sema (Polleux *et al.*, 1998, 2000). Si la perte de fonction de la spastin entraîne une altération du comportement des axones et/ou dendrites des neurones mutants en culture après l'ajout de Sema3A dans le milieu, nous déterminerons laquelle des isoformes de la spastin est responsable de cette réponse par des expériences de sauvetage phénotypique via la transfection de ces neurones. Nous pourrions également évaluer le rôle de drogues ciblant la dynamique des microtubules (Fassier *et al.*, 2013) sur la réponse des neurones corticaux mutants au signal Sema3A.

IV La voie des Bone Morphogenetic Proteins (BMP) dans la pathogénèse des PSH

Ces dix dernières années, la signalisation des Bone Morphogenetic Proteins (ou BMP) a émergé comme un mécanisme pathogénique commun à différentes formes de PSH. En effet, la protéine NIPA1 (codée par *SPG6*) joue un rôle dans la dégradation des récepteurs aux BMP (ou BMPR) en les internalisant et les adressant au lysosome (Wang *et al.*, 2007; Tsang *et al.*, 2009). L'atlastin-1 (codée par *SPG3A*) est également impliquée dans l'inhibition de la voie des BMP. Chez le poisson-zèbre et la drosophile, une suractivation de la voie des BMP est détectée dans les neurones moteurs des animaux déplétés en atlastin-1 (Fassier *et al.*, 2010; Summerville *et al.*, 2016). Par ailleurs, l'expression de formes mutantes de l'atlastin-1 perturbe le trafic des récepteurs aux BMP (Zhao and Hedera, 2013). Notons ici qu'atlastin-1 et NIPA1 interagissent et que cette interaction est abolie par des mutations pathogéniques, suggérant que ces deux protéines de PSH agissent ensemble dans l'inhibition de la voie des BMP (Botzolakis *et al.*, 2011). Spartin (codée par *SPG20*) est une protéine impliquée dans une forme rare de PSH, connue sous le nom de syndrome de Troyer, qui inhibe également la signalisation des BMP. En effet, il a été montré dans différents modèles cellulaires et animaux que la perte de fonction de spartin entraîne la suractivation de la voie des BMP (Tsang *et al.*, 2009; Renvoisé *et al.*, 2012; Nahm *et al.*, 2013). De plus, à l'instar d'atlastin-1 et de NIPA1, spartin participe à l'internalisation et à la dégradation des BMPR (Nahm *et al.*, 2013). Ajoutons à cette liste, les protéines PNPLA6 (*SPG39*) et SLC33A1 (*SPG42*) qui jouent, elles aussi un rôle inhibiteur de la voie des BMP dans des fibroblastes de patients et au cours du développement du poisson-zèbre (Song *et al.*, 2013; Mao *et al.*, 2015). En outre, les drosophiles mutantes *swiss cheese* (*sws*, orthologue chez la mouche de *SPG39*) présentent des défauts typiques de la neurodégénérescence, causés par la formation de vacuoles, ce qui pourrait suggérer que PNPLA6 inhibe la voie des BMP via une altération du trafic membranaire de ses récepteurs (Sujkowski *et al.*, 2015). Enfin, il a été proposé que la signalisation des BMP soit liée aux formes *SPG4* de PSH, au vu de l'augmentation anormale de la phosphorylation de Smad1/5, principaux effecteurs de la voie canonique BMP, dans des cellules

HeLa déplétées pour la spastin (Tsang *et al.*, 2009). Ainsi, notre caractérisation fonctionnelle de l'isoforme longue de la spastin s'inscrit dans les données de littérature, tout en apportant une preuve directe de l'implication de la voie des BMP dans les processus de navigation axonale des neurones moteurs spinaux au cours du développement d'un organisme vertébré.

Au vu de l'interaction spécifique entre l'isoforme longue de la spastin et l'atlastin-1 (Sanderson *et al.*, 2006; Evans *et al.*, 2006), on pouvait faire l'hypothèse que la forme M87 ne serait pas, ou à moindre échelle, impliquée dans la régulation de la signalisation des BMP. Cette hypothèse fut tout d'abord confirmée par la similarité des défauts de trajectoires axonales observées chez les embryons morphants ATG1 et déplétés principalement pour la forme longue DrM1 de la Spastin de poisson-zèbre, ainsi que chez les morphants *atlastin-1* et *NIPA1*, ce qui renforce la notion d'une interaction de ces trois protéines dans l'inhibition de la voie des BMP. Par la suite, la double injection de deux morpholinos ($MO_{sp}^{ATG1} + MO_{atl}$) ou ($MO_{sp}^{ATG2} + MO_{atl}$) à des doses substoechiométriques qui ne donnaient aucun phénotype en injection simple, nous a permis de montrer que la perte de fonction de DrM1 et de l'atlastin-1 aggrave significativement le phénotype axonal des neurones moteurs, ce qui n'est jamais observé pour le double *knockdown* de DrM61 et d'atlastin-1. Nous avons alors cherché à savoir si le phénotype axonal observé chez nos trois types de morphants était spécifique d'une dérégulation de la voie des BMP, indépendamment de la perte de fonction d'une de ces protéines de PSH. Dans ce but, nous avons utilisé le système *UAS/GAL4* pour surexprimer par un choc thermique une forme dominante négative du BMPRI de type I (BMPRI) ou une forme constitutivement active de BMPRI (Nikaido *et al.*, 1999; Pyati *et al.*, 2005) à un stade précis du développement correspondant à la croissance axonale des neurones moteurs spinaux (NMS). Nous avons ainsi démontré que la suractivation de la voie des BMP était nécessaire et suffisante pour engendrer des défauts sévères de navigation axonale des NMS. De plus, nous avons pu déterminer une fenêtre temporelle de l'effet de cette suractivation correspondant à la sortie des axones des NMS hors de la moelle épinière. En outre, ces défauts de trajectoire axonale observés chez nos morphants MO_{sp}^{ATG1} , MO_{atl} et $MONIPA1$ ont pu être partiellement sauvés par l'expression de la forme dominante négative du BMPRI et donc l'inhibition génétique de cette signalisation au cours de cette même fenêtre temporelle.

Ces résultats nous permettent de conclure que la voie des BMP est, d'une part, finement contrôlée par plusieurs protéines impliquées dans les PSH, et d'autre part, qu'elle est essentielle au développement et à la mise en place des circuits moteurs chez les vertébrés. Enfin, ce rôle critique de la voie BMP dans des axonopathie du système moteur a été retrouvé dans d'autres maladies neurologiques de ces neurones, comme une forme rare de sclérose latérale amyotrophique ou d'amyotrophie spinale, et impliquée dans la régénérescence axonale à la suite d'un trauma de la moelle épinière (Ratnaparkhi *et al.*, 2008; Bai *et al.*, 2011; Zhong and Zou, 2014).

Afin de déterminer quel(s) mécanisme(s) en aval de la signalisation BMP contribue(nt) à la pathogénèse des PSH, il serait probablement riche d'informations d'étudier les liens potentiels entre la dérégulation de la voie BMP et le défaut de transport axonal observé chez les souris *knockout SPG4*. Il a été montré que la signalisation des BMP régule la transmission synaptique des neurones moteurs via l'organisation du réseau de microtubules (MTs) au niveau des jonctions neuromusculaires de la drosophile (Ball *et al.*, 2015). De plus, une hausse de la signalisation BMP liée à la perte de fonction de spartin chez cet arthropode altère la croissance synaptique via une stabilisation anormalement accrue du réseau de MTs, un phénotype qui peut être sauvé par l'administration de vinblastine, un agent dépolymérisant des MTs (Nahm *et al.*, 2013). Ainsi, la dérégulation de la signalisation BMP issue de la perte de fonction de M1 spastin pourrait contribuer au phénotype de dilatations axonales dû à un défaut de l'activité de cassure des MTs de la spastin et observé dans les modèles murins *knockout* spastin mais également dans des neurones dérivés de cellules iPSC de patients *SPG4* (Tarrade *et al.*, 2006; Kasher *et al.*, 2009; Fassier *et al.*, 2013; Denton *et al.*, 2014; Havlicek *et al.*, 2014; Connell *et al.*, 2016). Grâce aux cultures primaires de neurones corticaux des souris mutantes pour la spastin (Fassier *et al.*, 2013), nous pourrions déterminer si la voie des BMP est suractivée dans ces neurones et si l'utilisation de drogues ciblant la dynamique des MTs parvient à bloquer les conséquences de la suractivation de cette voie. En parallèle, l'utilisation d'une drogue, la dorsomorphin ou le LDN-193189, qui inhibe la voie des BMP pourrait nous permettre de sauver le phénotype de dilatations axonales chez ces neurones mutants (Yu *et al.*, 2008a; Cannon *et al.*, 2010).

Une autre piste pour le rôle de l'isoforme M1 de la spastin dans la régulation de la voie des BMP provient des données émanant de l'étude des autres protéines de PSH régulant cette signalisation. En effet, la spastin est localisée au même compartiment cellulaire que la spartin, interagit directement avec l'atlastin-1, et indirectement (via atlastin-1) avec NIPA1 (Sanderson *et al.*, 2006; Evans *et al.*, 2006; Renvoisé *et al.*, 2010; Botzolakis *et al.*, 2011; Zhao and Hedera, 2013). Ces données suggèrent que ces différentes protéines de PSH puissent réguler la voie des BMP via un mécanisme cellulaire commun. Rappelons que la régulation de la voie des BMP par l'atlastin-1, la spartin et NIPA1 passe par l'internalisation et le trafic endosomal des BMPR (Wang *et al.*, 2007; Tsang *et al.*, 2009; Fassier *et al.*, 2010; Nahm *et al.*, 2013; Zhao and Hedera, 2013). Par ailleurs, notre équipe a montré dans le cadre d'une collaboration avec le groupe d'Evan Reid que la perte de fonction de la spastin dans des cellules humaines en culture ou chez l'embryon de poisson-zèbre entraîne des défauts de fission des tubules d'endosome, associés à une altération du trafic des récepteurs à la transferrin dans le modèle cellulaire (TfR; Allison *et al.*, 2013). Or, les TfR sont nécessaires à la transduction des signaux BMP au cours de la morphogénèse cranio-faciale (Lei *et al.*, 2016). Ainsi, la forme longue de la spastin pourrait contrôler la voie des BMP en régulant directement ou indirectement le trafic des BMPR afin de moduler la réponse des neurones moteurs aux signaux BMP émanant des muscles. Dans la poursuite de nos travaux, il serait intéressant d'analyser les interactions entre ces protéines de PSH et les différents BMPR par des expériences de co-immunoprécipitation. De plus, il est possible grâce à la transparence des larves de poisson-zèbre de suivre le trafic des BMPR marqués en conditions physiologiques ou de *knockdown* de chacune de ces protéines de PSH. Dans ce but, nous utiliserons des lignées transgéniques fondées sur le système *UAS/GAL4* qui permet l'expression d'un BMPR tagué dans un type cellulaire donné, couplée à différents marqueurs endosomaux tels que Rab5 (endosomes précoces), Rab7 (endosomes tardifs) ou encore Rab4 (endosomes de recyclage) fusionnés à la GFP. De plus, par des expériences de transplantation embryonnaire de tissus, nous suivrons la formation des circuits moteurs face à l'expression ectopique de différents ligands BMP surexprimés dans des tissus musculaires greffés.

Qu'en est-il du signal BMP, et accessoirement de sa source de provenance, capables de contrôler avec précision la migration des cônes de croissance des neurones moteurs spinaux ? Est-ce la voie canonique ou non canonique qui intervient dans ce phénomène de guidage axonal ? En plus de leur fonction classique de morphogènes au cours du développement embryonnaire précoce, les molécules de signalisation comme les BMP sont en effet connues pour jouer un rôle plus tardif dans le guidage axonal et l'établissement des jonctions synaptiques au cours du développement du système nerveux (Charron and Tessier-Lavigne, 2005; Van Battum *et al.*, 2015). Les différents ligands BMP se lient de manière homomérique ou hétéromérique à deux types de récepteurs : les récepteurs de type I (comprenant ALK2, ALK3 alias BMPRIA et ALK6 alias BMPRIB) et les récepteurs de type II (incluant BMPRII, ACTRIIA et ACTRIIB). Suite à la liaison du ligand et de ces récepteurs, la transduction du signal débouche sur l'activation spécifique de différents membres de la famille des protéines Smad. Une fois la protéine Smad activée par le couple récepteur/ligand, elle va se multimériser à l'aide d'un co-Smad (pour common-mediator Smad), afin d'être transloquée au noyau où elle jouera un rôle de régulation de l'expression génique avec d'autres co-activateurs ou co-répresseurs de la transcription (Liu and Niswander, 2005).

Un des médiateurs de la voie non canonique des BMP a été identifié comme clé dans la régulation de ces processus de navigation axonale : il s'agit de la LIMK1 (pour LIM-domain-containing protein kinase 1). Cette protéine se lie au récepteur BMPRII en l'absence de ligand BMP, ce qui inhibe son activité de phosphorylation de la cofilin. L'ajout de ligand BMP permet alors de libérer LIMK1 lui permettant de réguler la dynamique de l'actine via l'inactivation par phosphorylation de la cofilin (Foletta *et al.*, 2003; Liu and Niswander, 2005). Cette voie non canonique apparaît également centrale dans la réponse du cytosquelette d'actin à d'autres voies de signalisation. En effet, sa sur-expression inhibe les effets de l'EGF sur la polymérisation de l'actine via la phosphorylation de la cofilin (Zebda *et al.*, 2000). Enfin, un lien clair entre la LIMK1 et la croissance axonale a été établi chez l'embryon de poulet où l'expression de LIMK1 dans les ganglions dorsaux réprime l'avancée du cône de croissance et l'extension neuritique via la phosphorylation de la cofilin (Endo *et al.*, 2003). Mais si le rôle de certains morphogènes dans le guidage axonal a été clairement démontré, les mécanismes moléculaires en aval qui influencent directement le comportement du cône de croissance

en réponse à ces gradients de morphogènes demeurent obscurs et sujets à controverse. La navigation du cône de croissance est-elle contrôlée par l'activation de la voie canonique BMP/Smad via la régulation de la transcription de certains gènes cibles ? Ou par l'activation d'autres effecteurs des BMP comme la LIMK1, ou certaines MAP Kinases qui auraient un effet direct sur le remodelage du cytosquelette au sein du cône de croissance ? Ou encore par l'action concertée des voies canonique et non canonique ? Compte tenu de la rapidité avec laquelle le cône de croissance des neurones change de direction, s'arrête en pause ou se rétracte pour partir du côté opposé, il semble intuitivement peu probable que cet effet passe par des modifications de la transcription de gènes cibles. En outre, il a été montré que le changement d'orientation des cônes de croissance induit par l'application d'un gradient de BMP7 sur des cultures primaires de neurones spinaux de xénope se fait indépendamment de l'activation de la voie canonique BMP/Smad mais requérait l'activation de la LIMK1 et/ou de la phosphatase Slingshot par le récepteur BMPRII (Wen *et al.*, 2007). De plus, ces deux protéines modulent l'activité de la cofilin, et de ce fait contrôlent directement l'organisation du cytosquelette d'actin et de MTs. Néanmoins, au niveau de la jonction neuromusculaire de la drosophile, le contrôle de la croissance synaptique par la protéine Gbb (orthologue de BMP) s'accompagne d'une augmentation de la quantité de phospho-Smad dans le noyau du neurone présynaptique (McCabe *et al.*, 2003) qui engendre l'activation transcriptionnelle de Trio, un facteur d'échange du GTP pour la protéine G Rac (Rac-GEF ; Ball *et al.*, 2010). En effet, au cours de la croissance et du guidage de l'axone, Trio participe au remodelage du cytosquelette d'actin via l'activation de la protéine Rac. Enfin, les travaux antérieurs de l'équipe ont montré que le *knockdown* de l'atlastin-1 chez l'embryon de poisson-zèbre provoque une augmentation de la quantité de phospho-Smad1/5/8 dans les noyaux des neurones spinaux, ce qui suggère que les défauts de trajectoire des NMS pourraient être associés à une dérégulation de la transcription (Fassier *et al.*, 2010). De nombreuses études à venir seront nécessaires pour déterminer avec précision, et ce pour chaque type de neurones, si l'influence des BMP sur le guidage axonal passe par (i) une signalisation canonique avec régulation de l'activité

génique, (ii) non canonique avec un remodelage direct du réseau de MTs et d'actine au sein des cônes de croissance ou encore (iii) l'action simultanée des deux types de signalisation avec la régulation de l'expression génique survenant dans un deuxième temps pour conforter la prise de décision du cône de croissance, médiée en premier lieu par des modifications du cytosquelette.

BIBLIOGRAPHIE

Bibliographie

- Abel A, Fonknechten N, Hofer A, Dürr A, Cruaud C, Voit T, Weissenbach J, Brice A, Klimpe S, Auburger G, and Hazan J (2004) Early onset autosomal dominant spastic paraplegia caused by novel mutations in SPG3A. *Neurogenetics* **5**(4) 239–243
- Aberle H, Haghghi AP, Fetter RD, McCabe BD, Magalhães TR, and Goodman CS (2002) wishful thinking encodes a BMP type II receptor that regulates synaptic growth in *Drosophila*. *Neuron* **33**(4) 545–558
- Abou Jamra R, Philippe O, Raas-Rothschild A, Eck SH, Graf E, Buchert R, Borck G, Ekici A, Brockschmidt FF, Nöthen MM, Munnich A, Strom TM, Reis A, and Colleaux L (2011) Adaptor protein complex 4 deficiency causes severe autosomal-recessive intellectual disability, progressive spastic paraplegia, shy character, and short stature. *Am. J. Hum. Genet.* **88**(6) 788–795
- Adell MAY, Migliano SM, and Teis D (2016) ESCRT-III and Vps4 : a dynamic multipurpose tool for membrane budding and scission. *FEBS J.*
- Agromayor M, Carlton JG, Phelan JP, Matthews DR, Carlin LM, Ameer-Beg S, Bowers K, and Martin-Serrano J (2009) Essential role of HIST1 in cytokinesis. *Mol. Biol. Cell* **20**(5) 1374–1387
- Ahmad FJ, Yu W, McNally FJ, and Baas PW (1999) An essential role for katanin in severing microtubules in the neuron. *J. Cell Biol.* **145**(2) 305–315
- Akella JS, Wloga D, Kim J, Starostina NG, Lyons-Abbott S, Morrissette NS, Dougan ST, Kipreos ET, and Gaertig J (2010) MEC-17 is an alpha-tubulin acetyltransferase. *Nature* **467**(7312) 218–222

Bibliographie

- Alfaro-Aco R and Petry S (2015) Building the Microtubule Cytoskeleton Piece by Piece. *J. Biol. Chem.* **290**(28) 17154–17162
- Allison R, Lumb JH, Fassier C, Connell JW, Ten Martin D, Seaman MNJ, Hazan J, and Reid E (2013) An ESCRT-spastin interaction promotes fission of recycling tubules from the endosome. *J. Cell Biol.* **202**(3) 527–543
- Atorino L, Silvestri L, Koppen M, Cassina L, Ballabio A, Marconi R, Langer T, and Casari G (2003) Loss of m-AAA protease in mitochondria causes complex I deficiency and increased sensitivity to oxidative stress in hereditary spastic paraplegia. *J. Cell Biol.* **163**(4) 777–787
- Audebert S, Koulakoff A, Berwald-Netter Y, Gros F, Denoulet P, and Eddé B (1994) Developmental regulation of polyglutamylated alpha- and beta-tubulin in mouse brain neurons. *J. Cell. Sci.* **107** (Pt 8) 2313–2322
- Auer-Grumbach M, Schlotter-Weigel B, Lochmüller H, Strobl-Wildemann G, Auer-Grumbach P, Fischer R, Offenbacher H, Zwick EB, Robl T, Hartl G, Hartung HP, Wagner K, Windpassinger C, and Austrian Peripheral Neuropathy Study Group (2005) Phenotypes of the N88S Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy 2 mutation. *Ann. Neurol.* **57**(3) 415–424
- Baas PW, Karabay A, and Qiang L (2005) Microtubules cut and run. *Trends Cell Biol.* **15**(10) 518–524
- Babin PJ, Goizet C, and Raldúa D (2014) Zebrafish models of human motor neuron diseases : advantages and limitations. *Prog. Neurobiol.* **118** 36–58
- Bache KG, Slagsvold T, Cabezas A, Rosendal KR, Raiborg C, and Stenmark H (2004) The growth-regulatory protein HCRP1/hVps37A is a subunit of mammalian ESCRT-I and mediates receptor down-regulation. *Mol. Biol. Cell* **15**(9) 4337–4346
- Bai G, Chivatakarn O, Bonanomi D, Lettieri K, Franco L, Xia C, Stein E, Ma L, Lewcock JW, and Pfaff SL (2011) Presenilin-dependent receptor processing is required for axon guidance. *Cell* **144**(1) 106–118

- Bakowska JC, Jupille H, Fatheddin P, Puertollano R, and Blackstone C (2007) Troyer syndrome protein spartin is mono-ubiquitinated and functions in EGF receptor trafficking. *Mol. Biol. Cell* **18**(5) 1683–1692
- Ball RW, Warren-Paquin M, Tsurudome K, Liao EH, Elazzouzi F, Cavanagh C, An BS, Wang TT, White JH, and Haghighi AP (2010) Retrograde BMP signaling controls synaptic growth at the NMJ by regulating trio expression in motor neurons. *Neuron* **66**(4) 536–549
- Ball RW, Peled E, Guerrero G, and Isacoff EY (2015) BMP signaling and microtubule organization regulate synaptic strength. *Neuroscience*
- Barrett A and Hermann GJ (2016) A *Caenorhabditis elegans* Homologue of LYST Functions in Endosome and Lysosome-Related Organelle Biogenesis. *Traffic* **17**(5) 515–535
- Bartuzi P, Billadeau DD, Favier R, Rong S, Dekker D, Fedoseienko A, Fieten H, Wijers M, Levels JH, Huijkman N, Kloosterhuis N, van der Molen H, Brufau G, Groen AK, Elliott AM, Kuivenhoven JA, Plecko B, Grangl G, McGaughran J, Horton JD, Burstein E, Hofker MH, and van de Sluis B (2016) CCC- and WASH-mediated endosomal sorting of LDLR is required for normal clearance of circulating LDL. *Nat Commun* **7** 10961
- Baumgärtel V, Ivanchenko S, Dupont A, Sergeev M, Wiseman PW, Kräusslich HG, Bräuchle C, Müller B, and Lamb DC (2011) Live-cell visualization of dynamics of HIV budding site interactions with an ESCRT component. *Nat. Cell Biol.* **13**(4) 469–474
- Baxter SL, Allard DE, Crowl C, and Sherwood NT (2014) Cold temperature improves mobility and survival in *Drosophila* models of autosomal-dominant hereditary spastic paraplegia (AD-HSP). *Dis Model Mech* **7**(8) 1005–1012
- Bayat V, Jaiswal M, and Bellen HJ (2011) The BMP signaling pathway at the *Drosophila* neuromuscular junction and its links to neurodegenerative diseases. *Curr. Opin. Neurobiol.* **21**(1) 182–188

Bibliographie

- Bechara A, Nawabi H, Moret F, Yaron A, Weaver E, Bozon M, Abouzid K, Guan JL, Tessier-Lavigne M, Lemmon V, and Castellani V (2008) FAK-MAPK-dependent adhesion disassembly downstream of L1 contributes to semaphorin3A-induced collapse. *EMBO J.* **27**(11) 1549–1562
- Beetz C, Brodhun M, Moutzouris K, Kiehntopf M, Berndt A, Lehnert D, Deufel T, Bastmeyer M, and Schickel J (2004) Identification of nuclear localisation sequences in spastin (SPG4) using a novel Tetra-GFP reporter system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **318**(4) 1079–1084
- Beetz C, Nygren AOH, Schickel J, Auer-Grumbach M, Bürk K, Heide G, Kassubek J, Klimpe S, Klopstock T, Kreuz F, Otto S, Schüle R, Schöls L, Sperfeld AD, Witte OW, and Deufel T (2006) High frequency of partial SPAST deletions in autosomal dominant hereditary spastic paraplegia. *Neurology* **67**(11) 1926–1930
- Beetz C, Schüle R, Deconinck T, Tran-Viet KN, Zhu H, Kremer BPH, Frints SGM, van Zelst-Stams WAG, Byrne P, Otto S, Nygren AOH, Baets J, Smets K, Ceulemans B, Dan B, Nagan N, Kassubek J, Klimpe S, Klopstock T, Stolze H, Smeets HJM, Schrandt-Stumpel CTRM, Hutchinson M, van de Warrenburg BP, Braastad C, Deufel T, Pericak-Vance M, Schöls L, de Jonghe P, and Züchner S (2008) REEP1 mutation spectrum and genotype/phenotype correlation in hereditary spastic paraplegia type 31. *Brain* **131**(Pt 4) 1078–1086
- Beetz C, Koch N, Khundadze M, Zimmer G, Nietzsche S, Hertel N, Huebner AK, Mumtaz R, Schweizer M, Dirren E, Karle KN, Irintchev A, Alvarez V, Redies C, Westermann M, Kurth I, Deufel T, Kessels MM, Qualmann B, and Hübner CA (2013) A spastic paraplegia mouse model reveals REEP1-dependent ER shaping. *J. Clin. Invest.* **123**(10) 4273–4282
- Behan WM and Maia M (1974) Strümpell's familial spastic paraplegia : genetics and neuropathology. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.* **37**(1) 8–20
- Bien-Willner R, Sambuughin N, Holley H, Bodensteiner J, and Sivakumar K (2006) Childhood-onset spastic paraplegia with NIPA1 gene mutation. *J. Child Neurol.* **21**(11) 974–977
- Blackstone C (2012) Cellular pathways of hereditary spastic paraplegia. *Annu. Rev. Neurosci.* **35** 25–47

- Bloom GS and Goldstein LS (1998) Cruising along microtubule highways : how membranes move through the secretory pathway. *J. Cell Biol.* **140**(6) 1277–1280
- Boone PM, Liu P, Zhang F, Carvalho CMB, Towne CF, Batish SD, and Lupski JR (2011) Alu-specific microhomology-mediated deletion of the final exon of SPAST in three unrelated subjects with hereditary spastic paraplegia. *Genet. Med.* **13**(6) 582–592
- Boone PM, Yuan B, Campbell IM, Scull JC, Withers MA, Baggett BC, Beck CR, Shaw CJ, Stanekiewicz P, Moretti P, Goodwin WE, Hein N, Fink JK, Seong MW, Seo SH, Park SS, Karbassi ID, Batish SD, Ordóñez-Ugalde A, Quintáns B, Sobrido MJ, Stemmler S, and Lupski JR (2014) The Alu-Rich Genomic Architecture of SPAST Predisposes to Diverse and Functionally Distinct Disease-Associated CNV Alleles. *Am. J. Hum. Genet.* **95**(2) 143–161
- Botzolakis EJ, Zhao J, Gurba KN, Macdonald RL, and Hedera P (2011) The effect of HSP-causing mutations in SPG3A and NIPA1 on the assembly, trafficking, and interaction between atlastin-1 and NIPA1. *Mol. Cell. Neurosci.* **46**(1) 122–135
- Boucher D, Larcher JC, Gros F, and Denoulet P (1994) Polyglutamylation of tubulin as a progressive regulator of in vitro interactions between the microtubule-associated protein Tau and tubulin. *Biochemistry* **33**(41) 12471–12477
- Braschinsky M, Luus SM, Gross-Paju K, and Haldre S (2009) The prevalence of hereditary spastic paraplegia and the occurrence of SPG4 mutations in Estonia. *Neuroepidemiology* **32**(2) 89–93
- Bürger J, Fonknechten N, Hoeltzenbein M, Neumann L, Bratanoff E, Hazan J, and Reis A (2000) Hereditary spastic paraplegia caused by mutations in the SPG4 gene. *Eur. J. Hum. Genet.* **8**(10) 771–776. WOS :000089938600007
- Brignolio F, Leone M, Tribolo A, Rosso MG, Meineri P, and Schiffer D (1986) Prevalence of hereditary ataxias and paraplegias in the province of Torino, Italy. *Ital J Neurol Sci* **7**(4) 431–435
- Bruyn RP (1992) The neuropathology of hereditary spastic paraparesis. *Clin Neurol Neurosurg* **94** Suppl S16–18

Bibliographie

- Buck KB and Zheng JQ (2002) Growth cone turning induced by direct local modification of microtubule dynamics. *J. Neurosci.* **22**(21) 9358–9367
- Butler R, Wood JD, Landers JA, and Cunliffe VT (2010) Genetic and chemical modulation of spastin-dependent axon outgrowth in zebrafish embryos indicates a role for impaired microtubule dynamics in hereditary spastic paraplegia. *Dis Model Mech* **3**(11-12) 743–751
- Butler SJ and Dodd J (2003) A role for BMP heterodimers in roof plate-mediated repulsion of commissural axons. *Neuron* **38**(3) 389–401
- Canbaz D, Kirimtay K, Karaca E, and Karabay A (2011) SPG4 gene promoter regulation via Elk1 transcription factor. *J. Neurochem.* **117**(4) 724–734
- Cannon JE, Upton PD, Smith JC, and Morrell NW (2010) Intersegmental vessel formation in zebrafish : requirement for VEGF but not BMP signalling revealed by selective and non-selective BMP antagonists. *Br. J. Pharmacol.* **161**(1) 140–149
- Carpenter MB (1991) *Core Text of Neuroanatomy*. Williams & Wilkins
- Cartwright BR and Goodman JM (2012) Seipin : from human disease to molecular mechanism. *J. Lipid Res.* **53**(6) 1042–1055
- Casali C, Valente EM, Bertini E, Montagna G, Criscuolo C, De Michele G, Villanova M, Damiano M, Pierallini A, Brancati F, Scarano V, Tessa A, Cricchi F, Grieco GS, Muglia M, Carella M, Martini B, Rossi A, Amabile GA, Nappi G, Filla A, Dallapiccola B, and Santorelli FM (2004) Clinical and genetic studies in hereditary spastic paraplegia with thin corpus callosum. *Neurology* **62**(2) 262–268
- Casari G and Rugarli E (2001) Molecular basis of inherited spastic paraplegias. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **11**(3) 336–342
- Casari G, De Fusco M, Ciarmatori S, Zeviani M, Mora M, Fernandez P, De Michele G, Filla A, Coccozza S, Marconi R, Dürr A, Fontaine B, and Ballabio A (1998) Spastic paraplegia and OXPHOS impairment caused by mutations in paraplegin, a nuclear-encoded mitochondrial metalloprotease. *Cell* **93**(6) 973–983

-
- Castellani V, Chédotal A, Schachner M, Faivre-Sarrailh C, and Rougon G (2000) Analysis of the L1-deficient mouse phenotype reveals cross-talk between Sema3A and L1 signaling pathways in axonal guidance. *Neuron* **27**(2) 237–249
- Castellani V, Falk J, and Rougon G (2004) Semaphorin3A-induced receptor endocytosis during axon guidance responses is mediated by L1 CAM. *Mol. Cell. Neurosci.* **26**(1) 89–100
- Chandran J, Ding J, and Cai H (2007) Alsin and the molecular pathways of amyotrophic lateral sclerosis. *Mol. Neurobiol.* **36**(3) 224–231
- Chang HCH, Dimlich DN, Yokokura T, Mukherjee A, Kankel MW, Sen A, Sridhar V, Fulga TA, Hart AC, Van Vactor D, and Artavanis-Tsakonas S (2008) Modeling spinal muscular atrophy in *Drosophila*. *PLoS ONE* **3**(9) e3209
- Chang J, Lee S, and Blackstone C (2013) Protrudin binds atlastins and endoplasmic reticulum-shaping proteins and regulates network formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **110**(37) 14954–14959
- Chang J, Lee S, and Blackstone C (2014) Spastic paraplegia proteins spastizin and spatacin mediate autophagic lysosome reformation. *J. Clin. Invest.* **124**(12) 5249–5262
- Charron F and Tessier-Lavigne M (2005) Novel brain wiring functions for classical morphogens : a role as graded positional cues in axon guidance. *Development* **132**(10) 2251–2262
- Charvin D, Cifuentes-Diaz C, Fonknechten N, Joshi V, Hazan J, Melki J, and Betuing S (2003) Mutations of SPG4 are responsible for a loss of function of spastin, an abundant neuronal protein localized in the nucleus. *Hum. Mol. Genet.* **12**(1) 71–78
- Chevalier-Larsen E and Holzbaur ELF (2006) Axonal transport and neurodegenerative disease. *Biochim. Biophys. Acta* **1762**(11-12) 1094–1108
- Chiurchiù V, Orlacchio A, and Maccarrone M (2016) Is Modulation of Oxidative Stress an Answer ? The State of the Art of Redox Therapeutic Actions in Neurodegenerative Diseases. *Oxid Med Cell Longev* **2016** 7909380

Bibliographie

- Ciccarelli FD, Proukakis C, Patel H, Cross H, Azam S, Patton MA, Bork P, and Crosby AH (2003) The identification of a conserved domain in both spartin and spastin, mutated in hereditary spastic paraplegia. *Genomics* **81**(4) 437–441
- Claudiani P, Riano E, Errico A, Andolfi G, and Rugarli EI (2005) Spastin subcellular localization is regulated through usage of different translation start sites and active export from the nucleus. *Exp. Cell Res.* **309**(2) 358–369
- Cohen NR, Taylor JS, Scott LB, Guillery RW, Soriano P, and Furley AJ (1998) Errors in corticospinal axon guidance in mice lacking the neural cell adhesion molecule L1. *Curr. Biol.* **8**(1) 26–33
- Colavita A, Krishna S, Zheng H, Padgett RW, and Culotti JG (1998) Pioneer axon guidance by UNC-129, a *C. elegans* TGF-beta. *Science* **281**(5377) 706–709
- Conde C and Cáceres A (2009) Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites. *Nat. Rev. Neurosci.* **10**(5) 319–332
- Connell JW, Lindon C, Luzio JP, and Reid E (2009) Spastin couples microtubule severing to membrane traffic in completion of cytokinesis and secretion. *Traffic* **10**(1) 42–56
- Connell JW, Allison R, and Reid E (2016) Quantitative Gait Analysis Using a Motorized Treadmill System Sensitive Detects Motor Abnormalities in Mice Expressing ATPase Defective Spastin. *PLoS ONE* **11**(3) e0152413
- Corradini E, Babitt JL, and Lin HY (2009) The RGM/DRAGON family of BMP co-receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* **20**(5-6) 389–398
- Coutinho P, Ruano L, Loureiro JL, Cruz VT, Barros J, Tuna A, Barbot C, Guimarães J, Alonso I, Silveira I, Sequeiros J, Marques Neves J, Serrano P, and Silva MC (2013) Hereditary ataxia and spastic paraplegia in Portugal : a population-based prevalence study. *JAMA Neurol* **70**(6) 746–755
- Cox GA, Mahaffey CL, Nystuen A, Letts VA, and Frankel WN (2000) The mouse fidgetin gene defines a new role for AAA family proteins in mammalian development. *Nat. Genet.* **26**(2) 198–202

- Crippa F, Panzeri C, Martinuzzi A, Arnoldi A, Redaelli F, Tonelli A, Baschiroto C, Vazza G, Mostacciuolo ML, Daga A, Orso G, Profice P, Trabacca A, D'Angelo MG, Comi GP, Galbiati S, Lamperti C, Bonato S, Pandolfo M, Meola G, Musumeci O, Toscano A, Trevisan CP, Bresolin N, and Bassi MT (2006) Eight novel mutations in SPG4 in a large sample of patients with hereditary spastic paraplegia. *Arch. Neurol.* **63**(5) 750–755
- Daftary GS, Tetrault AM, Jorgensen EM, Sarno J, and Taylor HS (2011) A novel role for the AAA ATPase spastin as a HOXA10 transcriptional corepressor in Ishikawa endometrial cells. *Mol. Endocrinol.* **25**(9) 1539–1549
- Dang P, Smythe E, and Furley AJW (2012) TAG1 regulates the endocytic trafficking and signaling of the semaphorin3A receptor complex. *J. Neurosci.* **32**(30) 10370–10382
- Davenport A, Bivona A, Latson W, Lemanski LF, and Cheriya V (2016) Loss of Maspardin Attenuates the Growth and Maturation of Mouse Cortical Neurons. *Neurodegener Dis* **16**(3-4) 260–272
- de Bot ST, van de Warrenburg BPC, Kremer HPH, and Willemsen MaaP (2010) Child neurology : hereditary spastic paraplegia in children. *Neurology* **75**(19) e75–79
- DeLuca GC, Ebers GC, and Esiri MM (2004) The extent of axonal loss in the long tracts in hereditary spastic paraplegia. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **30**(6) 576–584
- Dent EW, Gupton SL, and Gertler FB (2011) The growth cone cytoskeleton in axon outgrowth and guidance. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**(3)
- Denton KR, Lei L, Grenier J, Rodionov V, Blackstone C, and Li XJ (2014) Loss of spastin function results in disease-specific axonal defects in human pluripotent stem cell-based models of hereditary spastic paraplegia. *Stem Cells* **32**(2) 414–423
- Depienne C, Tallaksen C, Lephay JY, Bricka B, Poëa-Guyon S, Fontaine B, Labauge P, Brice A, and Durr A (2006) Spastin mutations are frequent in sporadic spastic paraparesis and their spectrum is different from that observed in familial cases. *J. Med. Genet.* **43**(3) 259–265

Bibliographie

- Depienne C, Stevanin G, Brice A, and Durr A (2007a) Hereditary spastic paraplegias : an update. *Curr. Opin. Neurol.* **20**(6) 674–680
- Depienne C, Fedirko E, Faucheux JM, Forlani S, Bricka B, Goizet C, Lesourd S, Stevanin G, Ruberg M, Durr A, and Brice A (2007b) A de novo SPAST mutation leading to somatic mosaicism is associated with a later age at onset in HSP. *Neurogenetics* **8**(3) 231–233
- Depienne C, Fedirko E, Forlani S, Cazeneuve C, Ribaï P, Feki I, Tallaksen C, Nguyen K, Stankoff B, Ruberg M, Stevanin G, Durr A, and Brice A (2007c) Exon deletions of SPG4 are a frequent cause of hereditary spastic paraplegia. *J. Med. Genet.* **44**(4) 281–284
- Derivery E, Sousa C, Gautier JJ, Lombard B, Loew D, and Gautreau A (2009) The Arp2/3 activator WASH controls the fission of endosomes through a large multiprotein complex. *Dev. Cell* **17**(5) 712–723
- Dürr A, Davoine CS, Paternotte C, von Fellenberg J, Cogilnicean S, Coutinho P, Lamy C, Bourgeois S, Prud'homme JF, Penet C, Mas JL, Burgunder JM, Hazan J, Weissenbach J, Brice A, and Fontaine B (1996) Phenotype of autosomal dominant spastic paraplegia linked to chromosome 2. *Brain* **119** (Pt 5) 1487–1496
- Du F, Ozdowski EF, Kotowski IK, Marchuk DA, and Sherwood NT (2010) Functional conservation of human Spastin in a Drosophila model of autosomal dominant-hereditary spastic paraplegia. *Hum. Mol. Genet.* **19**(10) 1883–1896
- Duning T, Warnecke T, Schirmacher A, Schiffbauer H, Lohmann H, Mohammadi S, Young P, and Deppe M (2010) Specific pattern of early white-matter changes in pure hereditary spastic paraplegia. *Mov. Disord.* **25**(12) 1986–1992
- Eastman SW, Yassaee M, and Bieniasz PD (2009) A role for ubiquitin ligases and Spartin/SPG20 in lipid droplet turnover. *J. Cell Biol.* **184**(6) 881–894
- Eaton BA and Davis GW (2005) LIM Kinase1 controls synaptic stability downstream of the type II BMP receptor. *Neuron* **47**(5) 695–708

- Ebbing B, Mann K, Starosta A, Jaud J, Schöls L, Schüle R, and Woehlke G (2008) Effect of spastic paraplegia mutations in KIF5A kinesin on transport activity. *Hum. Mol. Genet.* **17**(9) 1245–1252
- Eckert T, Le DTV, Link S, Friedmann L, and Woehlke G (2012) Spastin's microtubule-binding properties and comparison to katanin. *PLoS ONE* **7**(12) e50161
- Edgar JM, McLaughlin M, Yool D, Zhang SC, Fowler JH, Montague P, Barrie JA, McCulloch MC, Duncan ID, Garbern J, Nave KA, and Griffiths IR (2004) Oligodendroglial modulation of fast axonal transport in a mouse model of hereditary spastic paraplegia. *J. Cell Biol.* **166**(1) 121–131
- Edwards TL, Clowes VE, Tsang HTH, Connell JW, Sanderson CM, Luzio JP, and Reid E (2009) Endogenous spartin (SPG20) is recruited to endosomes and lipid droplets and interacts with the ubiquitin E3 ligases AIP4 and AIP5. *Biochem. J.* **423**(1) 31–39
- Efimova N, Grimaldi A, Bachmann A, Frye K, Zhu X, Feoktistov A, Straube A, and Kaverina I (2014) Podosome-regulating kinesin KIF1C translocates to the cell periphery in a CLASP-dependent manner. *J. Cell. Sci.* **127**(Pt 24) 5179–5188
- Elia N, Sougrat R, Spurlin TA, Hurley JH, and Lippincott-Schwartz J (2011) Dynamics of endosomal sorting complex required for transport (ESCRT) machinery during cytokinesis and its role in abscission. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**(12) 4846–4851
- Endo M, Ohashi K, Sasaki Y, Goshima Y, Niwa R, Uemura T, and Mizuno K (2003) Control of growth cone motility and morphology by LIM kinase and Slingshot via phosphorylation and dephosphorylation of cofilin. *J. Neurosci.* **23**(7) 2527–2537
- Enzmann GU, Benton RL, Woock JP, Howard RM, Tsoulfas P, and Whittemore SR (2005) Consequences of noggin expression by neural stem, glial, and neuronal precursor cells engrafted into the injured spinal cord. *Exp. Neurol.* **195**(2) 293–304
- Erck C, Peris L, Andrieux A, Meissirel C, Gruber AD, Vernet M, Schweitzer A, Saoudi Y, Pointu H, Bosc C, Salin PA, Job D, and Wehland J (2005) A vital role of tubulin-tyrosine-ligase for neuronal organization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**(22) 7853–7858

Bibliographie

- Erichsen AK, Inderhaug E, Mattingsdal M, Eiklid K, and Tallaksen CME (2007) Seven novel mutations and four exon deletions in a collection of Norwegian patients with SPG4 hereditary spastic paraplegia. *Eur. J. Neurol.* **14**(7) 809–814
- Erichsen AK, Koht J, Stray-Pedersen A, Abdelnoor M, and Tallaksen CME (2009) Prevalence of hereditary ataxia and spastic paraplegia in southeast Norway : a population-based study. *Brain* **132**(Pt 6) 1577–1588
- Erlich Y, Edvardson S, Hodges E, Zenvirt S, Thekkat P, Shaag A, Dor T, Hannon GJ, and Elpeleg O (2011) Exome sequencing and disease-network analysis of a single family implicate a mutation in KIF1A in hereditary spastic paraparesis. *Genome Res.* **21**(5) 658–664
- Errico A, Ballabio A, and Rugarli EI (2002) Spastin, the protein mutated in autosomal dominant hereditary spastic paraplegia, is involved in microtubule dynamics. *Hum. Mol. Genet.* **11**(2) 153–163
- Errico A, Claudiani P, D’Addio M, and Rugarli EI (2004) Spastin interacts with the centrosomal protein NA14, and is enriched in the spindle pole, the midbody and the distal axon. *Hum. Mol. Genet.* **13**(18) 2121–2132
- Erschbamer M, Pernold K, and Olson L (2007) Inhibiting epidermal growth factor receptor improves structural, locomotor, sensory, and bladder recovery from experimental spinal cord injury. *J. Neurosci.* **27**(24) 6428–6435
- Evans KJ, Gomes ER, Reisenweber SM, Gundersen GG, and Luring BP (2005) Linking axonal degeneration to microtubule remodeling by Spastin-mediated microtubule severing. *J. Cell Biol.* **168**(4) 599–606
- Evans KJ, Keller C, Pavur K, Glasgow K, Conn B, and Luring B (2006) Interaction of two hereditary spastic paraplegia gene products, spastin and atlastin, suggests a common pathway for axonal maintenance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**(28) 10666–10671

- Fassier C, Hutt JA, Scholpp S, Lumsden A, Giros B, Nothias F, Schneider-Maunoury S, Houart C, and Hazan J (2010) Zebrafish atlastin controls motility and spinal motor axon architecture via inhibition of the BMP pathway. *Nat. Neurosci.* **13**(11) 1380–1387
- Fassier C, Tarrade A, Peris L, Courageot S, Mailly P, Dalard C, Delga S, Roblot N, Lefèvre J, Job D, Hazan J, Curmi PA, and Melki J (2013) Microtubule-targeting drugs rescue axonal swellings in cortical neurons from spastin knockout mice. *Dis Model Mech* **6**(1) 72–83
- Fei W, Li H, Shui G, Kapterian TS, Bielby C, Du X, Brown AJ, Li P, Wenk MR, Liu P, and Yang H (2011) Molecular characterization of seipin and its mutants : implications for seipin in triacylglycerol synthesis. *J. Lipid Res.* **52**(12) 2136–2147
- Feldner J, Becker T, Goishi K, Schweitzer J, Lee P, Schachner M, Klagsbrun M, and Becker CG (2005) Neuropilin-1a is involved in trunk motor axon outgrowth in embryonic zebrafish. *Dev. Dyn.* **234**(3) 535–549
- Ferrari-Toninelli G, Bonini SA, Bettinsoli P, Uberti D, and Memo M (2008) Microtubule stabilizing effect of notch activation in primary cortical neurons. *Neuroscience* **154**(3) 946–952
- Ferreirinha F, Quattrini A, Pirozzi M, Valsecchi V, Dina G, Broccoli V, Auricchio A, Piemonte F, Tozzi G, Gaeta L, Casari G, Ballabio A, and Rugarli EI (2004) Axonal degeneration in paraplegin-deficient mice is associated with abnormal mitochondria and impairment of axonal transport. *J. Clin. Invest.* **113**(2) 231–242
- Füger P, Sreekumar V, Schüle R, Kern JV, Stanchev DT, Schneider CD, Karle KN, Daub KJ, Siegert VK, Flötenmeyer M, Schwarz H, Schöls L, and Rasse TM (2012) Spastic paraplegia mutation N256S in the neuronal microtubule motor KIF5A disrupts axonal transport in a Drosophila HSP model. *PLoS Genet.* **8**(11) e1003066
- Filla A, De Michele G, Marconi R, Bucci L, Carillo C, Castellano AE, Iorio L, Kniahynicki C, Rossi F, and Campanella G (1992) Prevalence of hereditary ataxias and spastic paraplegias in Molise, a region of Italy. *J. Neurol.* **239**(6) 351–353
- Fink JK (2006) Hereditary spastic paraplegia. *Curr Neurol Neurosci Rep* **6**(1) 65–76

Bibliographie

- Fink JK (2013) Hereditary spastic paraplegia : clinico-pathologic features and emerging molecular mechanisms. *Acta Neuropathol.* **126**(3) 307–328
- Foletta VC, Lim MA, Soosairajah J, Kelly AP, Stanley EG, Shannon M, He W, Das S, Massague J, Bernard O, and Soosairajah J (2003) Direct signaling by the BMP type II receptor via the cytoskeletal regulator LIMK1. *J. Cell Biol.* **162**(6) 1089–1098
- Fonknechten N, Mavel D, Byrne P, Davoine CS, Cruaud C, Bönsch D, Boentsch D, Samson D, Coutinho P, Hutchinson M, McMonagle P, Burgunder JM, Tartaglione A, Heinzlef O, Feki I, Deufel T, Parfrey N, Brice A, Fontaine B, Prud'homme JF, Weissenbach J, Dürr A, and Hazan J (2000) Spectrum of SPG4 mutations in autosomal dominant spastic paraplegia. *Hum. Mol. Genet.* **9**(4) 637–644
- Freeman C, Seaman MNJ, and Reid E (2013) The hereditary spastic paraplegia protein strumpellin : characterisation in neurons and of the effect of disease mutations on WASH complex assembly and function. *Biochim. Biophys. Acta* **1832**(1) 160–173
- Frickey T and Lupas AN (2004) Phylogenetic analysis of AAA proteins. *J. Struct. Biol.* **146**(1-2) 2–10
- Friedman JR, Webster BM, Mastrorarde DN, Verhey KJ, and Voeltz GK (2010) ER sliding dynamics and ER-mitochondrial contacts occur on acetylated microtubules. *J. Cell Biol.* **190**(3) 363–375
- Friedman JR, Lackner LL, West M, DiBenedetto JR, Nunnari J, and Voeltz GK (2011) ER tubules mark sites of mitochondrial division. *Science* **334**(6054) 358–362
- Fukata Y, Itoh TJ, Kimura T, Ménager C, Nishimura T, Shiromizu T, Watanabe H, Inagaki N, Iwamatsu A, Hotani H, and Kaibuchi K (2002) CRMP-2 binds to tubulin heterodimers to promote microtubule assembly. *Nat. Cell Biol.* **4**(8) 583–591
- Gallon M and Cullen PJ (2015) Retromer and sorting nexins in endosomal sorting. *Biochem. Soc. Trans.* **43**(1) 33–47
- Gao Q and Goodman JM (2015) The lipid droplet-a well-connected organelle. *Front Cell Dev Biol* **3** 49

- Gil-Krzewska A, Wood SM, Murakami Y, Nguyen V, Chiang SCC, Cullinane AR, Peruzzi G, Gahl WA, Coligan JE, Introne WJ, Bryceson YT, and Krzewski K (2016) Chediak-Higashi syndrome : Lysosomal trafficking regulator domains regulate exocytosis of lytic granules but not cytokine secretion by natural killer cells. *J. Allergy Clin. Immunol.* **137**(4) 1165–1177
- Gómez B, Rodríguez-Carballo E, and Ventura F (2013) BMP signaling in telencephalic neural cell specification and maturation. *Front Cell Neurosci* **7** 87
- Goldstein LS (2001) Kinesin molecular motors : transport pathways, receptors, and human disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**(13) 6999–7003
- Goldstein LS and Yang Z (2000) Microtubule-based transport systems in neurons : the roles of kinesins and dyneins. *Annu. Rev. Neurosci.* **23** 39–71
- Goshima Y, Nakamura F, Strittmatter P, and Strittmatter SM (1995) Collapsin-induced growth cone collapse mediated by an intracellular protein related to UNC-33. *Nature* **376**(6540) 509–514
- Goyal U and Blackstone C (2013) Untangling the web : mechanisms underlying ER network formation. *Biochim. Biophys. Acta* **1833**(11) 2492–2498
- Goyal U, Renvoisé B, Chang J, and Blackstone C (2014) Spastin-Interacting Protein NA14/SSNA1 Functions in Cytokinesis and Axon Development. *PLoS ONE* **9**(11) e112428
- Griffiths I, Klugmann M, Anderson T, Yool D, Thomson C, Schwab MH, Schneider A, Zimmermann F, McCulloch M, Nadon N, and Nave KA (1998) Axonal swellings and degeneration in mice lacking the major proteolipid of myelin. *Science* **280**(5369) 1610–1613
- Guizetti J, Schermelleh L, Mäntler J, Maar S, Poser I, Leonhardt H, Müller-Reichert T, and Gerlich DW (2011) Cortical constriction during abscission involves helices of ESCRT-III-dependent filaments. *Science* **331**(6024) 1616–1620
- Guzik BW and Goldstein LSB (2004) Microtubule-dependent transport in neurons : steps towards an understanding of regulation, function and dysfunction. *Curr. Opin. Cell Biol.* **16**(4) 443–450

Bibliographie

- Hadano S, Otomo A, Kunita R, Suzuki-Utsunomiya K, Akatsuka A, Koike M, Aoki M, Uchiyama Y, Itoyama Y, and Ikeda JE (2010) Loss of ALS2/Alsin exacerbates motor dysfunction in a SOD1-expressing mouse ALS model by disturbing endolysosomal trafficking. *PLoS ONE* **5**(3) e9805
- Hansen J, Corydon TJ, Palmfeldt J, Dürr A, Fontaine B, Nielsen MN, Christensen JH, Gregersen N, and Bross P (2008) Decreased expression of the mitochondrial matrix proteases Lon and ClpP in cells from a patient with hereditary spastic paraplegia (SPG13). *Neuroscience* **153**(2) 474–482
- Hanson PI and Whiteheart SW (2005) AAA+ proteins : have engine, will work. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**(7) 519–529
- Harding AE (1983) Classification of the hereditary ataxias and paraplegias. *Lancet* **1**(8334) 1151–1155
- Hartman JJ, Mahr J, McNally K, Okawa K, Iwamatsu A, Thomas S, Cheesman S, Heuser J, Vale RD, and McNally FJ (1998) Katanin, a microtubule-severing protein, is a novel AAA ATPase that targets to the centrosome using a WD40-containing subunit. *Cell* **93**(2) 277–287
- Hashimoto Y, Shirane M, Matsuzaki F, Saita S, Ohnishi T, and Nakayama KI (2014) Protrudin regulates endoplasmic reticulum morphology and function associated with the pathogenesis of hereditary spastic paraplegia. *J. Biol. Chem.* **289**(19) 12946–12961
- Havlicek S, Kohl Z, Mishra HK, Prots I, Eberhardt E, Denguir N, Wend H, Plötz S, Boyer L, Marchetto MCN, Aigner S, Sticht H, Groemer TW, Hehr U, Lampert A, Schlötzer-Schrehardt U, Winkler J, Gage FH, and Winner B (2014) Gene dosage-dependent rescue of HSP neurite defects in SPG4 patients' neurons. *Hum. Mol. Genet.* **23**(10) 2527–2541
- Hazan J, Fonknechten N, Mavel D, Paternotte C, Samson D, Artiguenave F, Davoine CS, Cruaud C, Dürr A, Wincker P, Brottier P, Cattolico L, Barbe V, Burgunder JM, Prud'homme JF, Brice A, Fontaine B, Heilig B, and Weissenbach J (1999) Spastin, a new AAA protein, is altered in the most frequent form of autosomal dominant spastic paraplegia. *Nat. Genet.* **23**(3) 296–303

- He W, Bai G, Zhou H, Wei N, White NM, Lauer J, Liu H, Shi Y, Dumitru CD, Lettieri K, Shubayev V, Jordanova A, Guergueltcheva V, Griffin PR, Burgess RW, Pfaff SL, and Yang XL (2015) CMT2D neuropathy is linked to the neomorphic binding activity of glycyl-tRNA synthetase. *Nature* **526**(7575) 710–714
- Hecht MJ, Stolze H, Auf dem Brinke M, Giess R, Treig T, Winterholler M, Wissel J, and German Spasticity Education Group (2008) Botulinum neurotoxin type A injections reduce spasticity in mild to moderate hereditary spastic paraplegia—report of 19 cases. *Mov. Disord.* **23**(2) 228–233
- Hedera P, Eldevik OP, Maly P, Rainier S, and Fink JK (2005) Spinal cord magnetic resonance imaging in autosomal dominant hereditary spastic paraplegia. *Neuroradiology* **47**(10) 730–734
- Heinzlef O, Paternotte C, Mahieux F, Prud'homme JF, Dien J, Madigand M, Pouget J, Weissenbach J, Roullet E, and Hazan J (1998) Mapping of a complicated familial spastic paraplegia to locus SPG4 on chromosome 2p. *J. Med. Genet.* **35**(2) 89–93
- Hensiek A, Kirker S, and Reid E (2015) Diagnosis, investigation and management of hereditary spastic paraplegias in the era of next-generation sequencing. *J. Neurol.* **262**(7) 1601–1612
- Hentati A, Deng HX, Zhai H, Chen W, Yang Y, Hung WY, Azim AC, Bohlega S, Tandan R, Warner C, Laing NG, Cambi F, Mitsumoto H, Roos RP, Boustany RM, Ben Hamida M, Hentati F, and Siddique T (2000) Novel mutations in spastin gene and absence of correlation with age at onset of symptoms. *Neurology* **55**(9) 1388–1390
- Hill DR and Bowery NG (1981) 3H-baclofen and 3H-GABA bind to bicuculline-insensitive GABA B sites in rat brain. *Nature* **290**(5802) 149–152
- Hirst J, Irving C, and Borner GHH (2013a) Adaptor protein complexes AP-4 and AP-5 : new players in endosomal trafficking and progressive spastic paraplegia. *Traffic* **14**(2) 153–164
- Hirst J, Borner GHH, Edgar J, Hein MY, Mann M, Buchholz F, Antrobus R, and Robinson MS (2013b) Interaction between AP-5 and the hereditary spastic paraplegia proteins SPG11 and SPG15. *Mol. Biol. Cell* **24**(16) 2558–2569

Bibliographie

- Hirst J, Edgar JR, Esteves T, Darios F, Madeo M, Chang J, Roda RH, Dürr A, Anheim M, Gellera C, Li J, Züchner S, Mariotti C, Stevanin G, Blackstone C, Kruer MC, and Robinson MS (2015) Loss of AP-5 results in accumulation of aberrant endolysosomes : defining a new type of lysosomal storage disease. *Hum. Mol. Genet.* **24**(17) 4984–4996
- Holmes GL and Shaywitz BA (1977) Strumpell's pure familial spastic paraplegia : case study and review of the literature. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.* **40**(10) 1003–1008
- Hu J, Shibata Y, Zhu PP, Voss C, Rismanchi N, Prinz WA, Rapoport TA, and Blackstone C (2009) A class of dynamin-like GTPases involved in the generation of the tubular ER network. *Cell* **138**(3) 549–561
- Ivanova N, Löfgren A, Tournev I, Rousev R, Andreeva A, Jordanova A, Georgieva V, Deconinck T, Timmerman V, Kremensky I, De Jonghe P, and Mitev V (2006) Spastin gene mutations in Bulgarian patients with hereditary spastic paraplegia. *Clin. Genet.* **70**(6) 490–495
- Ivanova N, Claeys KG, Deconinck T, Litvinenko I, Jordanova A, Auer-Grumbach M, Haberlova J, Löfgren A, Smeyers G, Nelis E, Mercelis R, Plecko B, Priller J, Zámečník J, Ceulemans B, Erichsen AK, Björck E, Nicholson G, Sereda MW, Seeman P, Kremensky I, Mitev V, and De Jonghe P (2007) Hereditary spastic paraplegia 3A associated with axonal neuropathy. *Arch. Neurol.* **64**(5) 706–713
- Iwanaga H, Tsujino A, Shirabe S, Eguchi H, Fukushima N, Niikawa N, Yoshiura KI, and Eguchi K (2005) Large deletion involving the 5'-UTR in the spastin gene caused mild phenotype of autosomal dominant hereditary spastic paraplegia. *Am. J. Med. Genet. A* **133A**(1) 13–17
- Janke C (2014) The tubulin code : molecular components, readout mechanisms, and functions. *J. Cell Biol.* **206**(4) 461–472
- Janke C and Bulinski JC (2011) Post-translational regulation of the microtubule cytoskeleton : mechanisms and functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12**(12) 773–786
- Janke C and Kneussel M (2010) Tubulin post-translational modifications : encoding functions on the neuronal microtubule cytoskeleton. *Trends Neurosci.* **33**(8) 362–372

- Jinushi-Nakao S, Arvind R, Amikura R, Kinameri E, Liu AW, and Moore AW (2007) Knot/Collier and cut control different aspects of dendrite cytoskeleton and synergize to define final arbor shape. *Neuron* **56**(6) 963–978
- Joly N, Zhang N, and Buck M (2012) ATPase site architecture is required for self-assembly and remodeling activity of a hexameric AAA+ transcriptional activator. *Mol. Cell* **47**(3) 484–490
- Jouet M, Rosenthal A, Armstrong G, MacFarlane J, Stevenson R, Paterson J, Metzzenberg A, Ionasescu V, Temple K, and Kenwrick S (1994) X-linked spastic paraplegia (SPG1), MASA syndrome and X-linked hydrocephalus result from mutations in the L1 gene. *Nat. Genet.* **7**(3) 402–407
- Karabay A, Yu W, Solowska JM, Baird DH, and Baas PW (2004) Axonal growth is sensitive to the levels of katanin, a protein that severs microtubules. *J. Neurosci.* **24**(25) 5778–5788
- Karle KN, Schüle R, Klebe S, Otto S, Frischholz C, Liepelt-Scarfone I, and Schöls L (2013) Electrophysiological characterisation of motor and sensory tracts in patients with hereditary spastic paraplegia (HSP). *Orphanet J Rare Dis* **8** 158
- Kasher PR, De Vos KJ, Wharton SB, Manser C, Bennett EJ, Bingley M, Wood JD, Milner R, McDermott CJ, Miller CCJ, Shaw PJ, and Grierson AJ (2009) Direct evidence for axonal transport defects in a novel mouse model of mutant spastin-induced hereditary spastic paraplegia (HSP) and human HSP patients. *J. Neurochem.* **110**(1) 34–44
- Kassubek J, Sperfeld AD, Baumgartner A, Huppertz HJ, Riecker A, and Juengling FD (2006) Brain atrophy in pure and complicated hereditary spastic paraparesis : a quantitative 3D MRI study. *Eur. J. Neurol.* **13**(8) 880–886
- Katagiri T and Watabe T (2016) Bone Morphogenetic Proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **8**(6)
- Katsuno M, Adachi H, Banno H, Suzuki K, Tanaka F, and Sobue G (2011) Transforming growth factor- β signaling in motor neuron diseases. *Curr. Mol. Med.* **11**(1) 48–56
- Katzmann DJ, Odorizzi G, and Emr SD (2002) Receptor downregulation and multivesicular-body sorting. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**(12) 893–905

Bibliographie

- Kawaguchi K, Katsuyama Y, Kikkawa S, Setsu T, and Terashima T (2010) PKH26 is an excellent retrograde and anterograde fluorescent tracer characterized by a small injection site and strong fluorescence emission. *Arch. Histol. Cytol.* **73**(2) 65–72
- Khundadze M, Kollmann K, Koch N, Biskup C, Nietzsche S, Zimmer G, Hennings JC, Huebner AK, Symmank J, Jahic A, Ilina EI, Karle K, Schöls L, Kessels M, Bräulke T, Qualmann B, Kurth I, Beetz C, and Hübner CA (2013) A hereditary spastic paraplegia mouse model supports a role of ZFYVE26/SPASTIZIN for the endolysosomal system. *PLoS Genet.* **9**(12) e1003988
- Kirschner M and Schulze E (1986) Morphogenesis and the control of microtubule dynamics in cells. *J. Cell Sci. Suppl.* **5** 293–310
- Klebe S, Stolze H, Kopper F, Lorenz D, Wenzelburger R, Deuschl G, and Volkmann J (2005) Objective assessment of gait after intrathecal baclofen in hereditary spastic paraplegia. *J. Neurol.* **252**(8) 991–993
- 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**(6-7) 505–530
- Klecker T, Böckler S, and Westermann B (2014) Making connections : interorganelle contacts orchestrate mitochondrial behavior. *Trends Cell Biol.* **24**(9) 537–545
- Klemm RW, Norton JP, Cole RA, Li CS, Park SH, Crane MM, Li L, Jin D, Boye-Doe A, Liu TY, Shibata Y, Lu H, Rapoport TA, Farese RV, Blackstone C, Guo Y, and Mak HY (2013) A conserved role for atlastin GTPases in regulating lipid droplet size. *Cell Rep* **3**(5) 1465–1475
- Kok FO, Shin M, Ni CW, Gupta A, Grosse AS, van Impel A, Kirchmaier BC, Peterson-Maduro J, Kourkoulis G, Male I, DeSantis DF, Sheppard-Tindell S, Ebarasi L, Betsholtz C, Schulte-Merker S, Wolfe SA, and Lawson ND (2015) Reverse genetic screening reveals poor correlation between morpholino-induced and mutant phenotypes in zebrafish. *Dev. Cell* **32**(1) 97–108
- Krols M, van Isterdael G, Asselbergh B, Kremer A, Lippens S, Timmerman V, and Janssens S (2016) Mitochondria-associated membranes as hubs for neurodegeneration. *Acta Neuropathol.* **131**(4) 505–523

- Kwong JQ, Beal MF, and Manfredi G (2006) The role of mitochondria in inherited neurodegenerative diseases. *J. Neurochem.* **97**(6) 1659–1675
- Lacroix B, van Dijk J, Gold ND, Guizetti J, Aldrian-Herrada G, Rogowski K, Gerlich DW, and Janke C (2010) Tubulin polyglutamylation stimulates spastin-mediated microtubule severing. *J. Cell Biol.* **189**(6) 945–954
- Lamari F, Mochel F, Sedel F, and Saudubray JM (2013) Disorders of phospholipids, sphingolipids and fatty acids biosynthesis : toward a new category of inherited metabolic diseases. *J. Inherit. Metab. Dis.* **36**(3) 411–425
- Le Pichon CE, Dominguez SL, Solanoy H, Ngu H, Lewin-Koh N, Chen M, Eastham-Anderson J, Watts R, and Scarce-Levie K (2013) EGFR inhibitor erlotinib delays disease progression but does not extend survival in the SOD1 mouse model of ALS. *PLoS ONE* **8**(4) e62342
- Lei R, Zhang K, Liu K, Shao X, Ding Z, Wang F, Hong Y, Zhu M, Li H, and Li H (2016) Transferrin receptor facilitates TGF- β and BMP signaling activation to control craniofacial morphogenesis. *Cell Death Dis* **7**(6) e2282
- Leo L, Yu W, D’Rozario M, Waddell EA, Marena DR, Baird MA, Davidson MW, Zhou B, Wu B, Baker L, Sharp DJ, and Baas PW (2015) Vertebrate Fidgetin Restrains Axonal Growth by Severing Labile Domains of Microtubules. *Cell Rep* **12**(11) 1723–1730
- Leone M, Bottacchi E, D’Alessandro G, and Kustermann S (1995) Hereditary ataxias and paraplegias in Valle d’Aosta, Italy : a study of prevalence and disability. *Acta Neurol. Scand.* **91**(3) 183–187
- Lindsey JC, Lusher ME, McDermott CJ, White KD, Reid E, Rubinsztein DC, Bashir R, Hazan J, Shaw PJ, and Bushby KM (2000) Mutation analysis of the spastin gene (SPG4) in patients with hereditary spastic paraparesis. *J. Med. Genet.* **37**(10) 759–765
- Liu A and Niswander LA (2005) Bone morphogenetic protein signalling and vertebrate nervous system development. *Nat. Rev. Neurosci.* **6**(12) 945–954

Bibliographie

- Liu B, Chen H, Johns TG, and Neufeld AH (2006) Epidermal growth factor receptor activation : an upstream signal for transition of quiescent astrocytes into reactive astrocytes after neural injury. *J. Neurosci.* **26**(28) 7532–7540
- Liu K, Lei R, Li Q, Wang XX, Wu Q, An P, Zhang J, Zhu M, Xu Z, Hong Y, Wang F, Shen Y, Li H, and Li H (2016) Transferrin Receptor Controls AMPA Receptor Trafficking Efficiency and Synaptic Plasticity. *Sci Rep* **6** 21019
- Lo Giudice T, Lombardi F, Santorelli FM, Kawarai T, and Orlacchio A (2014) Hereditary spastic paraplegia : clinical-genetic characteristics and evolving molecular mechanisms. *Exp. Neurol.* **261** 518–539
- Lorrain M (1898) *Contribution à l'étude de la paraplégie spasmodique familiale : travail de la clinique des maladies du système nerveux à la Salpêtrière / par M. le Dr Maurice Lorrain,...*
- Lovell MA, Smith JL, and Markesbery WR (2006) Elevated zinc transporter-6 in mild cognitive impairment, Alzheimer disease, and pick disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **65**(5) 489–498
- Lumb JH, Connell JW, Allison R, and Reid E (2012) The AAA ATPase spastin links microtubule severing to membrane modelling. *Biochim. Biophys. Acta* **1823**(1) 192–197
- Lupas AN and Martin J (2002) AAA proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **12**(6) 746–753
- Ma DL, Chia SC, Tang YC, Chang MLJ, Probst A, Burgunder JM, and Tang FR (2006) Spastin in the human and mouse central nervous system with special reference to its expression in the hippocampus of mouse pilocarpine model of status epilepticus and temporal lobe epilepsy. *Neurochem. Int.* **49**(7) 651–664
- Magariello A, Muglia M, Patitucci A, Mazzei R, Conforti FL, Gabriele AL, Sprovieri T, Ungaro C, Gambardella A, Mancuso M, Siciliano G, Branca D, Aguglia U, de Angelis MV, Longo K, and Quattrone A (2006) Novel spastin (SPG4) mutations in Italian patients with hereditary spastic paraplegia. *Neuromuscul. Disord.* **16**(6) 387–390
- Mancuso G and Rugarli EI (2008) A cryptic promoter in the first exon of the SPG4 gene directs the synthesis of the 60-kDa spastin isoform. *BMC Biol.* **6** 31

- Manjaly ZR, Scott KM, Abhinav K, Wijesekera L, Ganesalingam J, Goldstein LH, Janssen A, Dougherty A, Willey E, Stanton BR, Turner MR, Ampong MA, Sakel M, Orrell RW, Howard R, Shaw CE, Leigh PN, and Al-Chalabi A (2010) The sex ratio in amyotrophic lateral sclerosis : A population based study. *Amyotroph Lateral Scler* **11**(5) 439–442
- Mannan AU, Krawen P, Sauter SM, Boehm J, Chronowska A, Paulus W, Neesen J, and Engel W (2006a) ZFYVE27 (SPG33), a novel spastin-binding protein, is mutated in hereditary spastic paraplegia. *Am. J. Hum. Genet.* **79**(2) 351–357
- Mannan AU, Boehm J, Sauter SM, Rauber A, Byrne PC, Neesen J, and Engel W (2006b) Spastin, the most commonly mutated protein in hereditary spastic paraplegia interacts with Reticulon 1 an endoplasmic reticulum protein. *Neurogenetics* **7**(2) 93–103
- Mao CX, Xiong Y, Xiong Z, Wang Q, Zhang YQ, and Jin S (2014) Microtubule-severing protein Katanin regulates neuromuscular junction development and dendritic elaboration in Drosophila. *Development* **141**(5) 1064–1074
- Mao F, Li Z, Zhao B, Lin P, Liu P, Zhai M, Liu Q, Shao C, Sun W, and Gong Y (2015) Identification and functional analysis of a SLC33A1 : c.339T>G (p.Ser113Arg) variant in the original SPG42 family. *Hum. Mutat.* **36**(2) 240–249
- Marcos S, Moreau J, Backer S, Job D, Andrieux A, and Bloch-Gallego E (2009) Tubulin tyrosination is required for the proper organization and pathfinding of the growth cone. *PLoS ONE* **4**(4) e5405
- Margetis K, Korfiatis S, Boutos N, Gatzonis S, Themistocleous M, Siatouni A, Dalivigka Z, Flaskas T, Stranjalis G, Boviatsis E, and Sakas D (2014) Intrathecal baclofen therapy for the symptomatic treatment of hereditary spastic paraplegia. *Clin Neurol Neurosurg* **123** 142–145
- Marqués G, Bao H, Haerry TE, Shimell MJ, Duchek P, Zhang B, and O'Connor MB (2002) The Drosophila BMP type II receptor Wishful Thinking regulates neuromuscular synapse morphology and function. *Neuron* **33**(4) 529–543
- Martignoni M, Riano E, and Rugarli EI (2008) The role of ZFYVE27/protrudin in hereditary spastic paraplegia. *Am. J. Hum. Genet.* **83**(1) 127–128 ; author reply 128–130

Bibliographie

- Martin HN and Fitz GW (1898) *The human body ; a text-book of anatomy, physiology, and hygiene ; with practical exercises*. New York, H. Holt and company
- Matsuda S, Miura E, Matsuda K, Kakegawa W, Kohda K, Watanabe M, and Yuzaki M (2008) Accumulation of AMPA receptors in autophagosomes in neuronal axons lacking adaptor protein AP-4. *Neuron* **57**(5) 730–745
- Matsushita-Ishiodori Y, Yamanaka K, and Ogura T (2007) The *C. elegans* homologue of the spastic paraplegia protein, spastin, disassembles microtubules. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **359**(1) 157–162
- Matsuura I, Taniguchi J, Hata K, Saeki N, and Yamashita T (2008) BMP inhibition enhances axonal growth and functional recovery after spinal cord injury. *J. Neurochem.* **105**(4) 1471–1479
- Matsuzaki F, Shirane M, Matsumoto M, and Nakayama KI (2011) Protrudin serves as an adaptor molecule that connects KIF5 and its cargoes in vesicular transport during process formation. *Mol. Biol. Cell* **22**(23) 4602–4620
- McCabe BD, Marqués G, Haghighi AP, Fetter RD, Crotty ML, Haerry TE, Goodman CS, and O'Connor MB (2003) The BMP homolog Gbb provides a retrograde signal that regulates synaptic growth at the *Drosophila* neuromuscular junction. *Neuron* **39**(2) 241–254
- McCabe BD, Hom S, Aberle H, Fetter RD, Marques G, Haerry TE, Wan H, O'Connor MB, Goodman CS, and Haghighi AP (2004) Highwire regulates presynaptic BMP signaling essential for synaptic growth. *Neuron* **41**(6) 891–905
- McDermott C, White K, Bushby K, and Shaw P (2000) Hereditary spastic paraparesis : a review of new developments. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.* **69**(2) 150–160
- McDermott CJ, Grierson AJ, Wood JD, Bingley M, Wharton SB, Bushby KMD, and Shaw PJ (2003) Hereditary spastic paraparesis : disrupted intracellular transport associated with spastin mutation. *Ann. Neurol.* **54**(6) 748–759

- McDermott CJ, Burness CE, Kirby J, Cox LE, Rao DG, Hewamadduma C, Sharrack B, Hadjivasiliou M, Chinnery PF, Dalton A, Shaw PJ, and UK and Irish HSP Consortium (2006) Clinical features of hereditary spastic paraplegia due to spastin mutation. *Neurology* **67**(1) 45–51
- McMonagle P, Byrne P, and Hutchinson M (2004) Further evidence of dementia in SPG4-linked autosomal dominant hereditary spastic paraplegia. *Neurology* **62**(3) 407–410
- McNally FJ and Vale RD (1993) Identification of katanin, an ATPase that severs and disassembles stable microtubules. *Cell* **75**(3) 419–429
- Meijer IA, Dupré N, Brais B, Cossette P, St-Onge J, Rioux MF, Benard M, and Rouleau GA (2007) SPG4 founder effect in French Canadians with hereditary spastic paraplegia. *Can J Neurol Sci* **34**(2) 211–214
- Mishra-Gorur K, Çağlayan AO, Schaffer AE, Chabu C, Henegariu O, Vonhoff F, Akgümüş GT, Nishimura S, Han W, Tu S, Baran B, Gümüş H, Dilber C, Zaki MS, Hossni HAA, Rivière JB, Kayserili H, Spencer EG, Rosti R, Schroth J, Per H, Çağlar C, Çağlar a, Dölen D, Baranoski JF, Kumandaş S, Minja FJ, Erson-Omay EZ, Mane SM, Lifton RP, Xu T, Keshishian H, Dobyns WB, Chi NC, Šestan N, Louvi A, Bilgüvar K, Yasuno K, Gleeson JG, and Günel M (2014) Mutations in KATNB1 cause complex cerebral malformations by disrupting asymmetrically dividing neural progenitors. *Neuron* **84**(6) 1226–1239
- Mitchison T and Kirschner M (1984) Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* **312**(5991) 237–242
- Mitne-Neto M, Kok F, Beetz C, Pessoa A, Bueno C, Graciani Z, Martyn M, Monteiro CBM, Mitne G, Hubert P, Nygren AOH, Valadares M, Cerqueira AMP, Starling A, Deufel T, and Zatz M (2007) A multi-exonic SPG4 duplication underlies sex-dependent penetrance of hereditary spastic paraplegia in a large Brazilian pedigree. *Eur. J. Hum. Genet.* **15**(12) 1276–1279
- Miyazono K, Kamiya Y, and Morikawa M (2010) Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction. *J. Biochem.* **147**(1) 35–51

Bibliographie

- Monroe N and Hill CP (2016) Meiotic Clade AAA ATPases : Protein Polymer Disassembly Machines. *J. Mol. Biol.* **428**(9 Pt B) 1897–1911
- Montenegro G, Rebelo AP, Connell J, Allison R, Babalini C, D'Aloia M, Montieri P, Schüle R, Ishiura H, Price J, Strickland A, Gonzalez MA, Baumbach-Reardon L, Deconinck T, Huang J, Bernardi G, Vance JM, Rogers MT, Tsuji S, De Jonghe P, Pericak-Vance MA, Schöls L, Orlandaccio A, Reid E, and Züchner S (2012) Mutations in the ER-shaping protein reticulon 2 cause the axon-degenerative disorder hereditary spastic paraplegia type 12. *J. Clin. Invest.* **122**(2) 538–544
- Morimura R, Nozawa K, Tanaka H, and Ohshima T (2013) Phosphorylation of Dpsyl2 (CRMP2) and Dpsyl3 (CRMP4) is required for positioning of caudal primary motor neurons in the zebrafish spinal cord. *Dev Neurobiol* **73**(12) 911–920
- Mottier-Pavie VI, Palacios V, Eliazer S, Scoggin S, and Buszczak M (2016) The Wnt pathway limits BMP signaling outside of the germline stem cell niche in *Drosophila* ovaries. *Dev. Biol.*
- Nahm M, Lee MJ, Parkinson W, Lee M, Kim H, Kim YJ, Kim S, Cho YS, Min BM, Bae YC, Broadie K, and Lee S (2013) Spartin regulates synaptic growth and neuronal survival by inhibiting BMP-mediated microtubule stabilization. *Neuron* **77**(4) 680–695
- Nasarre P, Constantin B, Drabkin HA, and Roche J (2005) Sémaphorines et cancers : état des lieux. *M/S : médecine sciences* **21**(6-7) 641–647
- Nasevicius A and Ekker SC (2000) Effective targeted gene 'knockdown' in zebrafish. *Nat. Genet.* **26**(2) 216–220
- Neuhäuser G, Wiffler C, and Opitz JM (1976) Familial spastic paraplegia with distal muscle wasting in the Old Order Amish ; atypical Troyer syndrome or "new" syndrome. *Clin. Genet.* **9**(3) 315–323
- Newton T (2016) Epistatic effects influence SPG4 HSP age of onset
- Nielsen JE, Johnsen B, Koefoed P, Scheuer KH, Grønbech-Jensen M, Law I, Krabbe K, Nørremølle A, Eiberg H, Søndergård H, Dam M, Rehfeld JF, Krarup C, Paulson OB, Hasholt L, and Sørensen SA (2004) Hereditary spastic paraplegia with cerebellar ataxia : a complex phenotype associated with a new SPG4 gene mutation. *Eur. J. Neurol.* **11**(12) 817–824

- Nikaido M, Tada M, Takeda H, Kuroiwa A, and Ueno N (1999) In vivo analysis using variants of zebrafish BMPR-IA : range of action and involvement of BMP in ectoderm patterning. *Development* **126**(1) 181–190
- Niwa S, Tanaka Y, and Hirokawa N (2008) KIF1Bbeta- and KIF1A-mediated axonal transport of presynaptic regulator Rab3 occurs in a GTP-dependent manner through DENN/MADD. *Nat. Cell Biol.* **10**(11) 1269–1279
- Nolden M, Ehses S, Koppen M, Bernacchia A, Rugarli EI, and Langer T (2005) The m-AAA protease defective in hereditary spastic paraplegia controls ribosome assembly in mitochondria. *Cell* **123**(2) 277–289
- Novarino G, Fenstermaker AG, Zaki MS, Hofree M, Silhavy JL, Heiberg AD, Abdellateef M, Rosti B, Scott E, Mansour L, Masri A, Kayserili H, Al-Aama JY, Abdel-Salam GMH, Karminejad A, Kara M, Kara B, Bozorgmehri B, Ben-Omran T, Mojahedi F, Mahmoud IGED, Bouslam N, Bouhouche A, Benomar A, Hanein S, Raymond L, Forlani S, Mascaro M, Selim L, Shehata N, Al-Allawi N, Bindu PS, Azam M, Gunel M, Caglayan A, Bilguvar K, Tolun A, Issa MY, Schroth J, Spencer EG, Rosti RO, Akizu N, Vaux KK, Johansen A, Koh AA, Megahed H, Durr A, Brice A, Stevanin G, Gabriel SB, Ideker T, and Gleeson JG (2014) Exome sequencing links corticospinal motor neuron disease to common neurodegenerative disorders. *Science* **343**(6170) 506–511
- Offen D, Barhum Y, Melamed E, Embacher N, Schindler C, and Ransmayr G (2009) Spinal cord mRNA profile in patients with ALS : comparison with transgenic mice expressing the human SOD-1 mutant. *J. Mol. Neurosci.* **38**(2) 85–93
- Ogura T and Wilkinson AJ (2001) AAA+ superfamily ATPases : common structure–diverse function. *Genes Cells* **6**(7) 575–597
- Okada Y, Yamazaki H, Sekine-Aizawa Y, and Hirokawa N (1995) The neuron-specific kinesin superfamily protein KIF1A is a unique monomeric motor for anterograde axonal transport of synaptic vesicle precursors. *Cell* **81**(5) 769–780

Bibliographie

- Orlacchio A, Kawarai T, Totaro A, Errico A, St George-Hyslop PH, Rugarli EI, and Bernardi G (2004) Hereditary spastic paraplegia : clinical genetic study of 15 families. *Arch. Neurol.* **61**(6) 849–855
- Orlacchio A, Babalini C, Borreca A, Patrono C, Massa R, Basaran S, Munhoz RP, Rogaeva EA, St George-Hyslop PH, Bernardi G, and Kawarai T (2010) SPATACSIN mutations cause autosomal recessive juvenile amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* **133**(Pt 2) 591–598
- Orso G, Martinuzzi A, Rossetto MG, Sartori E, Feany M, and Daga A (2005) Disease-related phenotypes in a Drosophila model of hereditary spastic paraplegia are ameliorated by treatment with vinblastine. *J. Clin. Invest.* **115**(11) 3026–3034
- Orso G, Pendin D, Liu S, Tosetto J, Moss TJ, Faust JE, Micaroni M, Egorova A, Martinuzzi A, McNew JA, and Daga A (2009) Homotypic fusion of ER membranes requires the dynamin-like GTPase atlastin. *Nature* **460**(7258) 978–983
- Orthmann-Murphy JL, Salsano E, Abrams CK, Bizzi A, Uziel G, Freidin MM, Lamantea E, Zeviani M, Scherer SS, and Pareyson D (2009) Hereditary spastic paraplegia is a novel phenotype for GJA12/GJC2 mutations. *Brain* **132**(Pt 2) 426–438
- O’Sullivan NC, Jahn TR, Reid E, and O’Kane CJ (2012) Reticulon-like-1, the Drosophila orthologue of the hereditary spastic paraplegia gene reticulon 2, is required for organization of endoplasmic reticulum and of distal motor axons. *Hum. Mol. Genet.* **21**(15) 3356–3365
- Palaisa KA and Granato M (2007) Analysis of zebrafish sidetracked mutants reveals a novel role for Plexin A3 in intraspinal motor axon guidance. *Development* **134**(18) 3251–3257
- Papadopoulos C, Orso G, Mancuso G, Herholz M, Gumeni S, Tadepalle N, Jüngst C, Tzschichholz A, Schauss A, Höning S, Trifunovic A, Daga A, and Rugarli EI (2015) Spastin Binds to Lipid Droplets and Affects Lipid Metabolism. *PLoS Genet.* **11**(4) e1005149
- Parikh P, Hao Y, Hosseinkhani M, Patil SB, Huntley GW, Tessier-Lavigne M, and Zou H (2011) Regeneration of axons in injured spinal cord by activation of bone morphogenetic protein/Smad1 signaling pathway in adult neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**(19) E99–107

- Park SH, Zhu PP, Parker RL, and Blackstone C (2010) Hereditary spastic paraplegia proteins REEP1, spastin, and atlastin-1 coordinate microtubule interactions with the tubular ER network. *J. Clin. Invest.* **120**(4) 1097–1110
- Park SY and Guo X (2014) Adaptor protein complexes and intracellular transport. *Biosci. Rep.* **34**(4)
- Patel S and Latterich M (1998) The AAA team : related ATPases with diverse functions. *Trends Cell Biol.* **8**(2) 65–71
- Pathak N, Austin CA, and Drummond IA (2011) Tubulin tyrosine ligase-like genes *tll3* and *tll6* maintain zebrafish cilia structure and motility. *J. Biol. Chem.* **286**(13) 11685–11695
- Patrono C, Scarano V, Cricchi F, Melone MAB, Chiriaco M, Napolitano A, Malandrini A, De Michele G, Petrozzi L, Giraldi C, Santoro L, Servidei S, Casali C, Filla A, and Santorelli FM (2005) Autosomal dominant hereditary spastic paraplegia : DHPLC-based mutation analysis of SPG4 reveals eleven novel mutations. *Hum. Mutat.* **25**(5) 506
- Pelosi L, Lanzillo B, Perretti A, Santoro L, Blumhardt L, and Caruso G (1991) Motor and somatosensory evoked potentials in hereditary spastic paraplegia. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.* **54**(12) 1099–1102
- Pensato V, Castellotti B, Gellera C, Pareyson D, Ciano C, Nanetti L, Salsano E, Piscosquito G, Sarto E, Eoli M, Moroni I, Soliveri P, Lamperti E, Chiapparini L, Di Bella D, Taroni F, and Mariotti C (2014) Overlapping phenotypes in complex spastic paraplegias SPG11, SPG15, SPG35 and SPG48. *Brain* **137**(Pt 7) 1907–1920
- Petrozzi L, Ricci G, Giglioli NJ, Siciliano G, and Mancuso M (2007) Mitochondria and neurodegeneration. *Biosci. Rep.* **27**(1-3) 87–104
- Polleux F, Giger RJ, Ginty DD, Kolodkin AL, and Ghosh A (1998) Patterning of cortical efferent projections by semaphorin-neuropilin interactions. *Science* **282**(5395) 1904–1906
- Polleux F, Morrow T, and Ghosh A (2000) Semaphorin 3A is a chemoattractant for cortical apical dendrites. *Nature* **404**(6778) 567–573

Bibliographie

- Polo JM, Calleja J, Combarros O, and Berciano J (1993) Hereditary "pure" spastic paraplegia : a study of nine families. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.* **56**(2) 175–181
- Potter KA, Kern MJ, Fullbright G, Bielawski J, Scherer SS, Yum SW, Li JJ, Cheng H, Han X, Venkata JK, Khan PAA, Rohrer B, and Hama H (2011) Central nervous system dysfunction in a mouse model of FA2H deficiency. *Glia* **59**(7) 1009–1021
- Proukakis C, Auer-Grumbach M, Wagner K, Wilkinson PA, Reid E, Patton MA, Warner TT, and Crosby AH (2003) Screening of patients with hereditary spastic paraplegia reveals seven novel mutations in the SPG4 (Spastin) gene. *Hum. Mutat.* **21**(2) 170
- Proukakis C, Moore D, Labrum R, Wood NW, and Houlden H (2011) Detection of novel mutations and review of published data suggests that hereditary spastic paraplegia caused by spastin (SPAST) mutations is found more often in males. *J. Neurol. Sci.* **306**(1-2) 62–65
- Pyati UJ, Webb AE, and Kimelman D (2005) Transgenic zebrafish reveal stage-specific roles for Bmp signaling in ventral and posterior mesoderm development. *Development* **132**(10) 2333–2343
- Qiang L, Yu W, Andreadis A, Luo M, and Baas PW (2006) Tau protects microtubules in the axon from severing by katanin. *J. Neurosci.* **26**(12) 3120–3129
- Qiang L, Yu W, Liu M, Solowska JM, and Baas PW (2010) Basic fibroblast growth factor elicits formation of interstitial axonal branches via enhanced severing of microtubules. *Mol. Biol. Cell* **21**(2) 334–344
- Racis L, Storti E, Pugliatti M, Agnetti V, Tessa A, and Santorelli FM (2014) Novel SPAST deletion and reduced DPY30 expression in a Spastic Paraplegia type 4 kindred. *BMC Med. Genet.* **15** 39
- Raiborg C, Wenzel EM, Pedersen NM, Olsvik H, Schink KO, Schultz SW, Vietri M, Nisi V, Bucci C, Brech A, Johansen T, and Stenmark H (2015) Repeated ER-endosome contacts promote endosome translocation and neurite outgrowth. *Nature* **520**(7546) 234–238
- Ratnaparkhi A, Lawless GM, Schweizer FE, Golshani P, and Jackson GR (2008) A Drosophila model of ALS : human ALS-associated mutation in VAP33A suggests a dominant negative mechanism. *PLoS ONE* **3**(6) e2334

- Reid E (1999) The hereditary spastic paraplegias. *J. Neurol.* **246**(11) 995–1003
- Reid E (2003) Science in motion : common molecular pathological themes emerge in the hereditary spastic paraplegias. *J. Med. Genet.* **40**(2) 81–86
- Reid E, Kloos M, Ashley-Koch A, Hughes L, Bevan S, Svenson IK, Graham FL, Gaskell PC, Dearlove A, Pericak-Vance MA, Rubinsztein DC, and Marchuk DA (2002) A kinesin heavy chain (KIF5A) mutation in hereditary spastic paraplegia (SPG10). *Am. J. Hum. Genet.* **71**(5) 1189–1194
- Reid E, Connell J, Edwards TL, Duley S, Brown SE, and Sanderson CM (2005) The hereditary spastic paraplegia protein spastin interacts with the ESCRT-III complex-associated endosomal protein CHMP1B. *Hum. Mol. Genet.* **14**(1) 19–38
- Renvoisé B, Parker RL, Yang D, Bakowska JC, Hurley JH, and Blackstone C (2010) SPG20 protein spartin is recruited to midbodies by ESCRT-III protein Ist1 and participates in cytokinesis. *Mol. Biol. Cell* **21**(19) 3293–3303
- Renvoisé B, Stadler J, Singh R, Bakowska JC, and Blackstone C (2012) Spg20^{-/-} mice reveal multimodal functions for Troyer syndrome protein spartin in lipid droplet maintenance, cytokinesis and BMP signaling. *Hum. Mol. Genet.* **21**(16) 3604–3618
- Renvoisé B, Chang J, Singh R, Yonekawa S, FitzGibbon EJ, Mankodi A, Vanderver A, Schindler A, Toro C, Gahl WA, Mahuran DJ, Blackstone C, and Pierson TM (2014) Lysosomal abnormalities in hereditary spastic paraplegia types SPG15 and SPG11. *Ann Clin Transl Neurol* **1**(6) 379–389
- Riano E, Martignoni M, Mancuso G, Cartelli D, Crippa F, Toldo I, Siciliano G, Di Bella D, Taroni F, Bassi MT, Cappelletti G, and Rugarli EI (2009) Pleiotropic effects of spastin on neurite growth depending on expression levels. *J. Neurochem.* **108**(5) 1277–1288
- Ribaï P, Depienne C, Fedirko E, Jothy AC, Viveweger C, Hahn-Barma V, Brice A, and Durr A (2008) Mental deficiency in three families with SPG4 spastic paraplegia. *Eur. J. Hum. Genet.* **16**(1) 97–104

Bibliographie

- Rizzolio S, Rabinowicz N, Rainero E, Lanzetti L, Serini G, Norman J, Neufeld G, and Tamagnone L (2012) Neuropilin-1-dependent regulation of EGF-receptor signaling. *Cancer Res.* **72**(22) 5801–5811
- Rode G, Maupas E, Luaute J, Courtois-Jacquin S, and Boisson D (2003) [Medical treatment of spasticity]. *Neurochirurgie* **49**(2-3 Pt 2) 247–255
- Roll-Mecak A and McNally FJ (2010) Microtubule-severing enzymes. *Curr. Opin. Cell Biol.* **22**(1) 96–103
- Roll-Mecak A and Vale RD (2005) The Drosophila homologue of the hereditary spastic paraplegia protein, spastin, severs and disassembles microtubules. *Curr. Biol.* **15**(7) 650–655
- Roll-Mecak A and Vale RD (2008) Structural basis of microtubule severing by the hereditary spastic paraplegia protein spastin. *Nature* **451**(7176) 363–367
- Ruano L, Melo C, Silva MC, and Coutinho P (2014) The global epidemiology of hereditary ataxia and spastic paraplegia : a systematic review of prevalence studies. *Neuroepidemiology* **42**(3) 174–183
- Rugarli EI and Langer T (2006) Translating m-AAA protease function in mitochondria to hereditary spastic paraplegia. *Trends Mol Med* **12**(6) 262–269
- Saijilafu, Hur EM, Liu CM, Jiao Z, Xu WL, and Zhou FQ (2013) PI3K-GSK3 signalling regulates mammalian axon regeneration by inducing the expression of Smad1. *Nat Commun* **4** 2690
- Salinas S, Carazo-Salas RE, Proukakis C, Cooper JM, Weston AE, Schiavo G, and Warner TT (2005) Human spastin has multiple microtubule-related functions. *J. Neurochem.* **95**(5) 1411–1420
- Salinas S, Proukakis C, Crosby A, and Warner TT (2008) Hereditary spastic paraplegia : clinical features and pathogenetic mechanisms. *Lancet Neurol* **7**(12) 1127–1138
- Sanderson CM, Connell JW, Edwards TL, Bright NA, Duley S, Thompson A, Luzio JP, and Reid E (2006) Spastin and atlastin, two proteins mutated in autosomal-dominant hereditary spastic paraplegia, are binding partners. *Hum. Mol. Genet.* **15**(2) 307–318

- Sato-Maeda M, Tawarayama H, Obinata M, Kuwada JY, and Shoji W (2006) Sema3a1 guides spinal motor axons in a cell- and stage-specific manner in zebrafish. *Development* **133**(5) 937–947
- Sato-Maeda M, Obinata M, and Shoji W (2008) Position fine-tuning of caudal primary motoneurons in the zebrafish spinal cord. *Development* **135**(2) 323–332
- Saugier-veber P, Munnich A, Bonneau D, Rozet JM, Le Merrer M, Gil R, and Boespflug-Tanguy O (1994) X-linked spastic paraplegia and Pelizaeus-Merzbacher disease are allelic disorders at the proteolipid protein locus. *Nat. Genet.* **6**(3) 257–262
- Sauter S, Mitterski B, Klimpe S, Bönsch D, Schöls L, Visbeck A, Papke T, Hopf HC, Engel W, Deufel T, Epplen JT, and Neesen J (2002) Mutation analysis of the spastin gene (SPG4) in patients in Germany with autosomal dominant hereditary spastic paraplegia. *Hum. Mutat.* **20**(2) 127–132
- Schady W and Sheard A (1990) A quantitative study of sensory function in hereditary spastic paraplegia. *Brain* **113** (Pt 3) 709–720
- Schickel J, Pamminger T, Ehram A, Münch S, Huang X, Klopstock T, Kurlemann G, Hemmerich P, Dubiel W, Deufel T, and Beetz C (2007) Isoform-specific increase of spastin stability by N-terminal missense variants including intragenic modifiers of SPG4 hereditary spastic paraplegia. *Eur. J. Neurol.* **14**(12) 1322–1328
- Schlager MA, Kapitein LC, Grigoriev I, Burzynski GM, Wulf PS, Keijzer N, de Graaff E, Fukuda M, Shepherd IT, Akhmanova A, and Hoogenraad CC (2010) Pericentrosomal targeting of Rab6 secretory vesicles by Bicaudal-D-related protein 1 (BICDR-1) regulates neuritogenesis. *EMBO J.* **29**(10) 1637–1651
- Schüle R, Siddique T, Deng HX, Yang Y, Donkervoort S, Hansson M, Madrid RE, Siddique N, Schöls L, and Björkhem I (2010) Marked accumulation of 27-hydroxycholesterol in SPG5 patients with hereditary spastic paresis. *J. Lipid Res.* **51**(4) 819–823

Bibliographie

- Schüle R, Wiethoff S, Martus P, Karle KN, Otto S, Klebe S, Klimpe S, Gallenmüller C, Kurzwelly D, Henkel D, Rimmele F, Stolze H, Kohl Z, Kassubek J, Klockgether T, Vielhaber S, Kamm C, Klopstock T, Bauer P, Züchner S, Liepelt-Scarfone I, and Schöls L (2016) Hereditary Spastic Paraplegia -clinico-genetic lessons from 608 patients. *Ann. Neurol.*
- Seeligmüller A (1876) Sklerose der Seintenstränge des Rückenmarks bei vier Kindern derselben Familie. *Dtsch Med Wschr* **2** 185–186
- Setoguchi T, Nakashima K, Takizawa T, Yanagisawa M, Ochiai W, Okabe M, Yone K, Komiya S, and Taga T (2004) Treatment of spinal cord injury by transplantation of fetal neural precursor cells engineered to express BMP inhibitor. *Exp. Neurol.* **189**(1) 33–44
- Sharma N, Bryant J, Wloga D, Donaldson R, Davis RC, Jerka-Dziadosz M, and Gaertig J (2007) Katanin regulates dynamics of microtubules and biogenesis of motile cilia. *J. Cell Biol.* **178**(6) 1065–1079
- Sharp DJ and Ross JL (2012) Microtubule-severing enzymes at the cutting edge. *J. Cell. Sci.* **125**(Pt 11) 2561–2569
- Shen YT, Gu Y, Su WF, Zhong JF, Jin ZH, Gu XS, and Chen G (2016) Rab27b is Involved in Lysosomal Exocytosis and Proteolipid Protein Trafficking in Oligodendrocytes. *Neurosci Bull*
- Sherwood NT, Sun Q, Xue M, Zhang B, and Zinn K (2004) Drosophila spastin regulates synaptic microtubule networks and is required for normal motor function. *PLoS Biol.* **2**(12) e429
- Shirane M and Nakayama KI (2006) Protrudin induces neurite formation by directional membrane trafficking. *Science* **314**(5800) 818–821
- Shoukier M, Neesen J, Sauter SM, Argyriou L, Doerwald N, Pantakani DVK, and Mannan AU (2009) Expansion of mutation spectrum, determination of mutation cluster regions and predictive structural classification of SPAST mutations in hereditary spastic paraplegia. *Eur. J. Hum. Genet.* **17**(2) 187–194

- Shubeita GT, Tran SL, Xu J, Vershinin M, Cermelli S, Cotton SL, Welte MA, and Gross SP (2008) Consequences of motor copy number on the intracellular transport of kinesin-1-driven lipid droplets. *Cell* **135**(6) 1098–1107
- Simpson MA, Cross H, Proukakis C, Pryde A, Hershberger R, Chatonnet A, Patton MA, and Crosby AH (2003) Maspardin is mutated in mast syndrome, a complicated form of hereditary spastic paraplegia associated with dementia. *Am. J. Hum. Genet.* **73**(5) 1147–1156
- Sánchez-Ferrero E, Coto E, Corao AI, Díaz M, Gámez J, Esteban J, Gonzalo JF, Pascual-Pascual SI, López De Munaín A, Morís G, Infante J, Del Castillo E, Márquez C, and Alvarez V (2012) Mitochondrial DNA polymorphisms/haplogroups in hereditary spastic paraplegia. *J. Neurol.* **259**(2) 246–250
- Soderblom C and Blackstone C (2006) Traffic accidents : molecular genetic insights into the pathogenesis of the hereditary spastic paraplegias. *Pharmacol. Ther.* **109**(1-2) 42–56
- Solowska JM and Baas PW (2015) Hereditary spastic paraplegia SPG4 : what is known and not known about the disease. *Brain*
- Solowska JM, Morfini G, Falnikar A, Himes BT, Brady ST, Huang D, and Baas PW (2008) Quantitative and functional analyses of spastin in the nervous system : implications for hereditary spastic paraplegia. *J. Neurosci.* **28**(9) 2147–2157
- Solowska JM, Garbern JY, and Baas PW (2010) Evaluation of loss of function as an explanation for SPG4-based hereditary spastic paraplegia. *Hum. Mol. Genet.* **19**(14) 2767–2779
- Solowska JM, D’Rozario M, Jean DC, Davidson MW, Marendra DR, and Baas PW (2014) Pathogenic mutation of spastin has gain-of-function effects on microtubule dynamics. *J. Neurosci.* **34**(5) 1856–1867
- Sonbuchner TM, Rath U, and Sharp DJ (2010) KL1 is a novel microtubule severing enzyme that regulates mitotic spindle architecture. *Cell Cycle* **9**(12) 2403–2411
- Song Y, Wang M, Mao F, Shao M, Zhao B, Song Z, Shao C, and Gong Y (2013) Knockdown of Pnpla6 protein results in motor neuron defects in zebrafish. *Dis Model Mech* **6**(2) 404–413

Bibliographie

- Stavoe AKH, Hill SE, Hall DH, and Colón-Ramos DA (2016) KIF1A/UNC-104 Transports ATG-9 to Regulate Neurodevelopment and Autophagy at Synapses. *Dev. Cell*
- Stevanin G, Santorelli FM, Azzedine H, Coutinho P, Chomilier J, Denora PS, Martin E, Ouvrard-Hernandez AM, Tessa A, Bouslam N, Lossos A, Charles P, Loureiro JL, Elleuch N, Confavreux C, Cruz VT, Ruberg M, Leguern E, Grid D, Tazir M, Fontaine B, Filla A, Bertini E, Durr A, and Brice A (2007) Mutations in SPG11, encoding spatacsin, are a major cause of spastic paraplegia with thin corpus callosum. *Nat. Genet.* **39**(3) 366–372
- Stewart A, Tsubouchi A, Rolls MM, Tracey WD, and Sherwood NT (2012) Katanin p60-like1 promotes microtubule growth and terminal dendrite stability in the larval class IV sensory neurons of *Drosophila*. *J. Neurosci.* **32**(34) 11631–11642
- Stone MC, Rao K, Gheres KW, Kim S, Tao J, La Rochelle C, Folker CT, Sherwood NT, and Rolls MM (2012) Normal spastin gene dosage is specifically required for axon regeneration. *Cell Rep* **2**(5) 1340–1350
- Strate I, Tessadori F, and Bakkens J (2015) Glypican4 promotes cardiac specification and differentiation by attenuating canonical Wnt and Bmp signaling. *Development* **142**(10) 1767–1776
- Strümpell DA (1880) Beiträge zur Pathologie des Rückenmarks. *Archiv f. Psychiatrie* **10**(3) 676–717
- Sudo H and Baas PW (2010) Acetylation of microtubules influences their sensitivity to severing by katanin in neurons and fibroblasts. *J. Neurosci.* **30**(21) 7215–7226
- Sujkowski A, Rainier S, Fink JK, and Wessells RJ (2015) Delayed Induction of Human NTE (PN-PLA6) Rescues Neurodegeneration and Mobility Defects of *Drosophila* swiss cheese (sws) Mutants. *PLoS ONE* **10**(12) e0145356
- Summerton J (1999) Morpholino antisense oligomers : the case for an RNase H-independent structural type. *Biochim. Biophys. Acta* **1489**(1) 141–158
- Summerville J, Faust J, Fan E, Pendin D, Daga A, Formella J, Stern M, and McNew JA (2016) The effects of ER morphology on synaptic structure and function in *Drosophila melanogaster*. *J. Cell. Sci.*

- Svenson IK, Ashley-Koch AE, Gaskell PC, Riney TJ, Cumming WJ, Kingston HM, Hogan EL, Boustany RM, Vance JM, Nance MA, Pericak-Vance MA, and Marchuk DA (2001a) Identification and expression analysis of spastin gene mutations in hereditary spastic paraplegia. *Am. J. Hum. Genet.* **68**(5) 1077–1085
- Svenson IK, Ashley-Koch AE, Pericak-Vance MA, and Marchuk DA (2001b) A second leaky splice-site mutation in the spastin gene. *Am. J. Hum. Genet.* **69**(6) 1407–1409
- Svenson IK, Kloos MT, Gaskell PC, Nance MA, Garbern JY, Hisanaga Si, Pericak-Vance MA, Ashley-Koch AE, and Marchuk DA (2004) Intragenic modifiers of hereditary spastic paraplegia due to spastin gene mutations. *Neurogenetics* **5**(3) 157–164
- Svenson IK, Kloos MT, Jacon A, Gallione C, Horton AC, Pericak-Vance MA, Ehlers MD, and Marchuk DA (2005) Subcellular localization of spastin : implications for the pathogenesis of hereditary spastic paraplegia. *Neurogenetics* **6**(3) 135–141
- Tallaksen CM, Dürr A, and Brice A (2001) Recent advances in hereditary spastic paraplegia. *Curr. Opin. Neurol.* **14**(4) 457–463
- Tanaka Y, Niwa S, Dong M, Farkhondeh A, Wang L, Zhou R, and Hirokawa N (2016) The Molecular Motor KIF1A Transports the TrkA Neurotrophin Receptor and Is Essential for Sensory Neuron Survival and Function. *Neuron* **90**(6) 1215–1229
- Tarrade A, Fassier C, Courageot S, Charvin D, Vitte J, Peris L, Thorel A, Mouisel E, Fonknechten N, Roblot N, Seilhean D, Diérich A, Hauw JJ, and Melki J (2006) A mutation of spastin is responsible for swellings and impairment of transport in a region of axon characterized by changes in microtubule composition. *Hum. Mol. Genet.* **15**(24) 3544–3558
- Taylor HS and Fei X (2005) Emx2 regulates mammalian reproduction by altering endometrial cell proliferation. *Mol. Endocrinol.* **19**(11) 2839–2846
- Taylor JL, White SR, Lauring B, and Kull FJ (2012) Crystal structure of the human spastin AAA domain. *J. Struct. Biol.* **179**(2) 133–137

Bibliographie

- Teis D, Saksena S, and Emr SD (2008) Ordered assembly of the ESCRT-III complex on endosomes is required to sequester cargo during MVB formation. *Dev. Cell* **15**(4) 578–589
- 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**(6) 511–538
- Thiam AR and Forêt L (2016) The physics of lipid droplet nucleation, growth and budding. *Biochim. Biophys. Acta* **1861**(8 Pt A) 715–722
- Trotta N, Orso G, Rossetto MG, Daga A, and Broadie K (2004) The hereditary spastic paraplegia gene, spastin, regulates microtubule stability to modulate synaptic structure and function. *Curr. Biol.* **14**(13) 1135–1147
- Tsang HTH, Edwards TL, Wang X, Connell JW, Davies RJ, Durrington HJ, O’Kane CJ, Luzio JP, and Reid E (2009) The hereditary spastic paraplegia proteins NIPA1, spastin and spartin are inhibitors of mammalian BMP signalling. *Hum. Mol. Genet.* **18**(20) 3805–3821
- Uchida Y, Ohshima T, Sasaki Y, Suzuki H, Yanai S, Yamashita N, Nakamura F, Takei K, Ihara Y, Mikoshiba K, Kolattukudy P, Honnorat J, and Goshima Y (2005) Semaphorin3A signalling is mediated via sequential Cdk5 and GSK3beta phosphorylation of CRMP2 : implication of common phosphorylating mechanism underlying axon guidance and Alzheimer’s disease. *Genes Cells* **10**(2) 165–179
- Vale RD (1991) Severing of stable microtubules by a mitotically activated protein in *Xenopus* egg extracts. *Cell* **64**(4) 827–839
- Valenstein ML and Roll-Mecak A (2016) Graded Control of Microtubule Severing by Tubulin Glutamylation. *Cell* **164**(5) 911–921
- Van Battum EY, Brignani S, and Pasterkamp RJ (2015) Axon guidance proteins in neurological disorders. *Lancet Neurol*
- van Dijk J, Rogowski K, Miro J, Lacroix B, Eddé B, and Janke C (2007) A targeted multienzyme mechanism for selective microtubule polyglutamylation. *Mol. Cell* **26**(3) 437–448

- Vantaggiato C, Crimella C, Airoidi G, Polishchuk R, Bonato S, Brighina E, Scarlato M, Musumeci O, Toscano A, Martinuzzi A, Santorelli FM, Ballabio A, Bresolin N, Clementi E, and Bassi MT (2013) Defective autophagy in spastizin mutated patients with hereditary spastic paraparesis type 15. *Brain* **136**(Pt 10) 3119–3139
- Varga RE, Khundadze M, Damme M, Nietzsche S, Hoffmann B, Stauber T, Koch N, Hennings JC, Franzka P, Huebner AK, Kessels MM, Biskup C, Jentsch TJ, Qualmann B, Braulke T, Kurth I, Beetz C, and Hübner CA (2015) In Vivo Evidence for Lysosome Depletion and Impaired Autophagic Clearance in Hereditary Spastic Paraplegia Type SPG11. *PLoS Genet.* **11**(8) e1005454
- Venkova K, Christov A, Kamaluddin Z, Kobalka P, Siddiqui S, and Hensley K (2014) Semaphorin 3A signaling through neuropilin-1 is an early trigger for distal axonopathy in the SOD1G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **73**(7) 702–713
- Verny C, Guegen N, Desquiret V, Chevrollier A, Prundean A, Dubas F, Cassereau J, Ferre M, Amati-Bonneau P, Bonneau D, Reynier P, and Procaccio V (2011) Hereditary spastic paraplegia-like disorder due to a mitochondrial ATP6 gene point mutation. *Mitochondrion* **11**(1) 70–75
- Vietri M, Schink KO, Campsteijn C, Wegner CS, Schultz SW, Christ L, Thoresen SB, Brech A, Raiborg C, and Stenmark H (2015) Spastin and ESCRT-III coordinate mitotic spindle disassembly and nuclear envelope sealing. *Nature*
- Vitriol EA and Zheng JQ (2012) Growth cone travel in space and time : the cellular ensemble of cytoskeleton, adhesion, and membrane. *Neuron* **73**(6) 1068–1081
- Voeltz GK, Prinz WA, Shibata Y, Rist JM, and Rapoport TA (2006) A class of membrane proteins shaping the tubular endoplasmic reticulum. *Cell* **124**(3) 573–586
- Wali G, Sutharsan R, Fan Y, Stewart R, Tello Velasquez J, Sue CM, Crane DI, and Mackay-Sim A (2016) Mechanism of impaired microtubule-dependent peroxisome trafficking and oxidative stress in SPAST-mutated cells from patients with Hereditary Spastic Paraplegia. *Sci Rep* **6** 27004
- Walsh DW, Godson C, Brazil DP, and Martin F (2010) Extracellular BMP-antagonist regulation in development and disease : tied up in knots. *Trends Cell Biol.* **20**(5) 244–256

Bibliographie

- Wang RN, Green J, Wang Z, Deng Y, Qiao M, Peabody M, Zhang Q, Ye J, Yan Z, Denduluri S, Idowu O, Li M, Shen C, Hu A, Haydon RC, Kang R, Mok J, Lee MJ, Luu HL, and Shi LL (2014) Bone Morphogenetic Protein (BMP) signaling in development and human diseases. *Genes Dis* **1**(1) 87–105
- Wang X, Shaw WR, Tsang HTH, Reid E, and O’Kane CJ (2007) Drosophila spichthyin inhibits BMP signaling and regulates synaptic growth and axonal microtubules. *Nat. Neurosci.* **10**(2) 177–185
- Waterman-Storer CM and Salmon ED (1998) Endoplasmic reticulum membrane tubules are distributed by microtubules in living cells using three distinct mechanisms. *Curr. Biol.* **8**(14) 798–806
- Welte MA (2015) Expanding roles for lipid droplets. *Curr. Biol.* **25**(11) R470–481
- Wen Z, Han L, Bamburg JR, Shim S, Ming GL, and Zheng JQ (2007) BMP gradients steer nerve growth cones by a balancing act of LIM kinase and Slingshot phosphatase on ADF/cofilin. *J. Cell Biol.* **178**(1) 107–119
- Wharton SB, McDermott CJ, Grierson AJ, Wood JD, Gelsthorpe C, Ince PG, and Shaw PJ (2003) The cellular and molecular pathology of the motor system in hereditary spastic paraparesis due to mutation of the spastin gene. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **62**(11) 1166–1177
- White KD, Ince PG, Lusher M, Lindsey J, Cookson M, Bashir R, Shaw PJ, and Bushby KM (2000) Clinical and pathologic findings in hereditary spastic paraparesis with spastin mutation. *Neurology* **55**(1) 89–94
- White SR, Evans KJ, Lary J, Cole JL, and Luring B (2007) Recognition of C-terminal amino acids in tubulin by pore loops in Spastin is important for microtubule severing. *J. Cell Biol.* **176**(7) 995–1005
- Wilkinson PA, Crosby AH, Turner C, Bradley LJ, Ginsberg L, Wood NW, Schapira AH, and Warner TT (2004) A clinical, genetic and biochemical study of SPG7 mutations in hereditary spastic paraplegia. *Brain* **127**(Pt 5) 973–980

- Wood JD, Landers JA, Bingley M, McDermott CJ, Thomas-McArthur V, Gleadall LJ, Shaw PJ, and Cunliffe VT (2006) The microtubule-severing protein Spastin is essential for axon outgrowth in the zebrafish embryo. *Hum. Mol. Genet.* **15**(18) 2763–2771
- Xia CH, Roberts EA, Her LS, Liu X, Williams DS, Cleveland DW, and Goldstein LSB (2003) Abnormal neurofilament transport caused by targeted disruption of neuronal kinesin heavy chain KIF5A. *J. Cell Biol.* **161**(1) 55–66
- Xiao Q, Du Y, Wu W, and Yip HK (2010) Bone morphogenetic proteins mediate cellular response and, together with Noggin, regulate astrocyte differentiation after spinal cord injury. *Exp. Neurol.* **221**(2) 353–366
- Yamasaki M, Arita N, Hiraga S, Izumoto S, Morimoto K, Nakatani S, Fujitani K, Sato N, and Hayakawa T (1995) A clinical and neuroradiological study of X-linked hydrocephalus in Japan. *J. Neurosurg.* **83**(1) 50–55
- Yamauchi K, Phan KD, and Butler SJ (2008) BMP type I receptor complexes have distinct activities mediating cell fate and axon guidance decisions. *Development* **135**(6) 1119–1128
- Yang D, Rismanchi N, Renvoisé B, Lippincott-Schwartz J, Blackstone C, and Hurley JH (2008) Structural basis for midbody targeting of spastin by the ESCRT-III protein CHMP1B. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **15**(12) 1278–1286
- Yang Y, Mahaffey CL, Bérubé N, Nystuen A, and Frankel WN (2005) Functional characterization of fidgetin, an AAA-family protein mutated in fidget mice. *Exp. Cell Res.* **304**(1) 50–58
- Yao D, Doré JJ, and Leof EB (2000) FKBP12 is a negative regulator of transforming growth factor-beta receptor internalization. *J. Biol. Chem.* **275**(17) 13149–13154
- Yip AG, Dürr A, Marchuk DA, Ashley-Koch A, Hentati A, Rubinsztein DC, and Reid E (2003) Meta-analysis of age at onset in spastin-associated hereditary spastic paraplegia provides no evidence for a correlation with mutational class. *J. Med. Genet.* **40**(9) e106

Bibliographie

- Yonekawa Y, Harada A, Okada Y, Funakoshi T, Kanai Y, Takei Y, Terada S, Noda T, and Hirokawa N (1998) Defect in synaptic vesicle precursor transport and neuronal cell death in KIF1A motor protein-deficient mice. *J. Cell Biol.* **141**(2) 431–441
- Yu PB, Hong CC, Sachidanandan C, Babitt JL, Deng DY, Hoyng SA, Lin HY, Bloch KD, and Peterson RT (2008a) Dorsomorphin inhibits BMP signals required for embryogenesis and iron metabolism. *Nat. Chem. Biol.* **4**(1) 33–41
- Yu W, Solowska JM, Qiang L, Karabay A, Baird D, and Baas PW (2005) Regulation of microtubule severing by katanin subunits during neuronal development. *J. Neurosci.* **25**(23) 5573–5583
- Yu W, Qiang L, Solowska JM, Karabay A, Korulu S, and Baas PW (2008b) The microtubule-severing proteins spastin and katanin participate differently in the formation of axonal branches. *Mol. Biol. Cell* **19**(4) 1485–1498
- Zebda N, Bernard O, Bailly M, Welte S, Lawrence DS, and Condeelis JS (2000) Phosphorylation of ADF/cofilin abolishes EGF-induced actin nucleation at the leading edge and subsequent lamellipod extension. *J. Cell Biol.* **151**(5) 1119–1128
- Zempel H, Luedtke J, Kumar Y, Biernat J, Dawson H, Mandelkow E, and Mandelkow EM (2013) Amyloid- β oligomers induce synaptic damage via Tau-dependent microtubule severing by TLL6 and spastin. *EMBO J.* **32**(22) 2920–2937
- Zhang C, Li D, Ma Y, Yan J, Yang B, Li P, Yu A, Lu C, and Ma X (2012) Role of spastin and protrudin in neurite outgrowth. *J. Cell. Biochem.* **113**(7) 2296–2307
- Zhang D, Rogers GC, Buster DW, and Sharp DJ (2007a) Three microtubule severing enzymes contribute to the "Pacman-flux" machinery that moves chromosomes. *J. Cell Biol.* **177**(2) 231–242
- Zhang X, Yuan Z, Zhang Y, Yong S, Salas-Burgos A, Koomen J, Olashaw N, Parsons JT, Yang XJ, Dent SR, Yao TP, Lane WS, and Seto E (2007b) HDAC6 modulates cell motility by altering the acetylation level of cortactin. *Mol. Cell* **27**(2) 197–213

Zhao J and Hedera P (2013) Hereditary spastic paraplegia-causing mutations in atlastin-1 interfere with BMPRII trafficking. *Mol. Cell. Neurosci.* **52** 87–96

Zhong J and Zou H (2014) BMP signaling in axon regeneration. *Curr. Opin. Neurobiol.* **27** 127–134

Zhu PP, Soderblom C, Tao-Cheng JH, Stadler J, and Blackstone C (2006) SPG3A protein atlastin-1 is enriched in growth cones and promotes axon elongation during neuronal development. *Hum. Mol. Genet.* **15**(8) 1343–1353

Zou Y and Lyuksyutova AI (2007) Morphogens as conserved axon guidance cues. *Curr. Opin. Neurobiol.* **17**(1) 22–28

Nicolas Jardin

ROLE DE LA SPASTIN DANS LE DEVELOPPEMENT DES CIRCUITS MOTEURS ET LEUR DEGENERESCENCE DANS LES PARAPLEGIES SPASTIQUES HEREDITAIRES

Résumé

Les mutations du gène *SPG4* codant la spastin sont responsables de la forme la plus fréquente de Paraplégies Spastiques Héritaires (PSH), des maladies neurologiques caractérisées par une dégénérescence des faisceaux cortico-spinaux. La spastin, ainsi que son homologue p60-katanin sont des enzymes de cassure des microtubules (MSE) essentielles à la croissance des neurones moteurs spinaux (NMS) chez l'embryon de poisson-zèbre mais dont le rôle dans les processus de guidage axonal également dépendant des microtubules (MTs) demeurent énigmatiques.

Les principaux objectifs de ma thèse ont consisté à préciser le rôle et le degré de redondance fonctionnelle existant entre ces deux MSE lors de l'établissement des circuits moteurs chez ce téléosté et de clarifier les mécanismes pathogéniques à l'origine des PSH liées au gène *SPG4*.

J'ai tout d'abord contribué à montrer que la p60-Katanin contrôle la trajectoire des axones des NMS et la mobilité des larves de façon dose-dépendante et non redondante avec la spastin. De plus, notre étude identifie la polyglutamylation des MTs par TLL6 comme un élément clé de l'activité de la p60-Katanin lors de ce processus.

Sur le même modèle, j'ai révélé un rôle différentiel des isoformes majoritaires de la spastin (résultant d'une traduction alternative, M1 et M61) au cours du développement des NMS en démontrant un rôle coopératif de M1 et d'autres protéines de PSH dans l'inhibition de la voie des BMPs et révélant un rôle pour M61 en aval de la signalisation Neuropilin-1. Ces données suggèrent que l'altération de ces deux grandes voies de signalisation essentielles au développement des NMS pourrait contribuer à la pathogénèse des formes *SPG4*.

Abstract

Mutations in *SPG4*, encoding spastin cause the major form of Hereditary Spastic Paraplegias (HSP), a paralytic disorder characterised by the degeneration of the corticospinal tracts. Spastin and its close homologue p60-katanin are microtubule-severing enzymes (MSE) required for spinal motor neuron (SMN) axon extension during zebrafish development. However, their roles in SMN axon navigation which also rely on microtubules (MTs) remain elusive.

My PhD work aimed at refining the functional specificity and redundancy of these MSE during motor circuit wiring and clarifying the physiopathology of *SPG4*-linked HSP.

I have first contributed to show that p60-Katanin controls SMN axon targeting and larval locomotion in a dose-dependent manner. We also demonstrated that Spastin and p60-Katanin play differential roles in SMN navigation and identified TLL6-mediated MT polyglutamylation as a key event in regulating p60-Katanin activity in this process.

Concomitantly, I have conducted a functional analysis of spastin main isoforms (resulting from alternative translation, M1 and M61) during zebrafish development, which reveals their critical and specific involvement in two distinct signalling pathways that are both essential for motor circuit wiring and locomotor behaviours. This study has provided compelling evidences for a concerted role for M1 and other HSP proteins in the down-regulation of the BMP pathway and reveals a specific role for M87 as a downstream effector of Neuropilin-1 signalling. Altogether, our study emphasizes defective BMP signalling as a key pathogenic mechanism in HSP, and shows that dysregulation of the Neuropilin-1 pathway may equally contribute to *SPG4*-linked HSP.