

Annexe 1 : Modèle de Rapport scientifique final (3 pages maximum)

Financement de la filière FILSLAN des bourses FILSLAN pour Master/Thèse 2022/2023

Période du Rapport d'Activité du 04/01/2023 au 05/06/2023

Le Rapport d'Activité scientifique Final doit être établi par lauréat de l'appel à candidatures pour les bourses FILSLAN de Master/Thèse et signé par le Responsable de l'équipe de recherche qui supervise le projet. Il devra être envoyé sous format PDF à filslan@chu-limoges.fr, conformément aux stipulations de l'article 3 de la présente Convention

Nom de l'établissement : MMDN, INSERM U1198, Université de Montpellier

Nom du responsable de l'équipe de recherche : Jean-Charles Liévens

Nom du lauréat de la bourse : Kerry-Ann Hautot Brault

Date prévisionnelle de soutenance du projet de Master : 14 juin 2023

Introduction

La paraplégie spastique de type 7 (HSP7) fait partie des paraplégies spastiques héréditaires qui forment un groupe de maladies neurodégénératives impliquant les voies corticospinales. HSP7 a une prévalence de 0,5 à 10 cas pour 100 000. Les principaux symptômes de cette pathologie sont une spasticité progressive des membres inférieurs et une ataxie cérébelleuse. Les formes plus complexes de la pathologie sont caractérisées par des symptômes neurologiques supplémentaires telles qu'une atrophie optique ou une ophtalmoplégie externe progressive. HSP7 est due à une mutation du gène *SPG7* qui code pour la Paraplégine.

La Paraplégine est une protéase située dans la membrane interne mitochondriale. Pour sa fonction protéase elle s'associe à AFG3L2 (AFG3 Like Matrix AAA Peptidase Subunit 2) pour former un hexamère. Ce complexe protéique joue un rôle important dans le contrôle qualité des protéines. En effet, ces protéases utilisent l'énergie dérivée de l'ATP afin d'éliminer les protéines mitochondriales mal conformées. Le complexe intervient également dans les fonctions mitochondriales essentielles telle que la dynamique mitochondriale comprenant les processus de fusion et fission mitochondriale. La Paraplégine joue également un rôle dans le transport calcique au sein de la mitochondrie. Elle permet de réguler l'ouverture du canal de la membrane interne mitochondriale MCU (Mitochondrial Calcium Uniporter) afin d'éviter une accumulation trop importante de calcium au sein de la cellule et donc une mort cellulaire.

À ce jour, 114 mutations de *SPG7* potentiellement pathogéniques ont été identifiées comme responsables de HSP7. Parmi les mutations de *SPG7*, la mutation Ala510Val (A510V) est la plus commune. Cette mutation est présente dans la population générale avec une fréquence allant de 0,5 à 1%. Jusqu'à présent, cette mutation a été surtout étudiée en présence d'autres mutations de *SPG7*. Il n'est donc pas possible de conclure sur la part jouée pour chacune des différentes mutations.

D'autre part, alors que HSP7 est considérée comme une maladie récessive, certains patients ne présentant qu'un seul allèle *SPG7* mutée et un allèle normal montrent pourtant des désordres neurologiques.

Les objectifs de ce projet ont été double : analyser l'impact de la mutation A510V seule sur le fonctionnement cellulaire et plus particulièrement sur celui des mitochondries et comparer l'impact de la mutation A510V à l'état homozygote et hétérozygote simple. Afin de répondre à ces objectifs, une collection de fibroblastes humains a été utilisée. Le laboratoire où j'ai réalisé mon stage de Master dispose de fibroblastes issus de 4 individus contrôles, de 3 patients homozygotes pour la mutation A510V et d'un patient hétérozygote simple pour la mutation.

Des résultats récents au sein de notre laboratoire ont montré que la mutation A510V à l'état homozygote et hétérozygote simple n'impactait pas les taux d'expression de la Paraplégine. Il a également été démontré que cette mutation induisait une diminution de la surface occupée par les mitochondries dans les fibroblastes des patients. A partir de ces données, nous avons premièrement cherché à savoir si le partenaire protéique de la Paraplégine, AFG3L2 subissait des variations d'expression en présence de la mutation A510V. En parallèle, au vu de la baisse de la surface occupée par les mitochondries, nous avons cherché à déterminer si celle-ci était associée à une modification de la dynamique mitochondriale et/ou à une élimination des mitochondries par autophagie (mitophagie).

Résultats principaux

Au cours de mon stage, j'ai dans un premier temps réalisé des western-blots pour détecter la protéine partenaire de la Paraplégine, AFG3L2. Les analyses quantitatives réalisées à partir de 3 blots indépendants ne montrent aucune différence significative dans l'expression de la protéine AFG3L2 entre les fibroblastes des patients HSP7 et des individus contrôles.

Nous avons d'autre part évalué la morphologie des éléments formant le réseau mitochondrial. Des immunomarquages de la translocase mitochondriale TOM20 ont été réalisés sur les fibroblastes issus de patients ou contrôles. A partir de ceux-ci, nous avons imagé et analysé 30 cellules par individu grâce à la microscopie confocale à haute résolution. Puis, une reconstitution du réseau mitochondrial des cellules en 3D a été effectuée à l'aide du logiciel Imaris. Nos analyses quantitatives indiquent qu'il n'y a aucune différence du volume moyen des éléments formant le réseau mitochondrial entre les fibroblastes des patients homozygotes et ceux des individus contrôles. En revanche, l'analyse de la forme des éléments (ellipticité) révèle une modification significative pour les patients homozygotes. De manière surprenante, les éléments du réseau mitochondrial du patient hétérozygote simple ont un volume significativement plus faible mais pas de modification de l'ellipticité par rapport aux fibroblastes des patients homozygotes et des individus contrôles.

Afin de déterminer si la mutation A510V était capable d'induire une mitophagie, la colocalisation entre le marqueur mitochondrial TOM20 et le marqueur des autophagosomes LC3 a été examinée. L'étude a porté sur des fibroblastes en condition basale et après un traitement au CCCP, agent découplant mitochondrial connu pour induire un stress et entraîner une mitophagie. L'analyse quantitative de la colocalisation des spots LC3 par rapport aux mitochondries montre qu'il n'y a pas de modification significative du pourcentage de colocalisation chez les fibroblastes des patients homozygote ou hétérozygote par rapport aux fibroblastes d'individus contrôles. De même, aucune modification n'est à noter pour le pourcentage de colocalisation entre les fibroblastes des différentes conditions après traitement au CCCP.

Discussion

Nos résultats de Western blot indiquent que la mutation A510V seule n'affecte pas l'expression protéique de la Paraplégine, ni de son partenaire AFG3L2. Une variation d'AFG3L2 aurait été

envisageable afin de compenser l'effet de la mutation de la Paraplégine. D'autres études sont nécessaires comme celle de l'interaction entre la Paraplégine et AFG3L2.

Nos résultats montrent que les patients homozygotes n'ont pas de variation de volume moyen des éléments constituant le réseau mitochondrial. Il n'est donc pas possible de conclure sur une modification de la dynamique mitochondriale. Par contre la forme des mitochondries est modifiée, indiquant un impact de la mutation A510V à l'état homozygote sur la morphologie des mitochondries. De plus, il n'y a aucune variation de la colocalisation entre les mitochondries et LC3. Ceci suggère que la mutation A510V à l'état homozygote n'induit pas une dégradation des mitochondries par mitophagie.

Quant au patient hétérozygote, ses fibroblastes montrent une diminution du volume moyen des éléments mitochondriaux. Cette diminution étant associée à celle de la surface mitochondriale, une fragmentation du réseau mitochondrial est à considérer. Il n'y a aucune colocalisation entre les mitochondries et LC3. De même qu'à l'état homozygote, la mutation A510V à l'état hétérozygote simple n'est pas capable d'induire une mitophagie. Ainsi, le phénotype du patient hétérozygote simple semble différer de celui des patients homozygotes. Ces résultats sont toutefois à nuancer car on ne peut pas exclure que d'autres mutations non connues au moment du séquençage ne soient présentes chez ce patient.

Je tiens à remercier vivement la filière FILSLAN pour son soutien dans ma formation en Master et pour le projet de recherche auquel j'ai participé.

Superviseur

JC Liévens

