



HAL
open science

Caractérisation des souris CHMP2Bintron5, un modèle d'étude du continuum SLA-DFT

Aurelia Vernay

► **To cite this version:**

Aurelia Vernay. Caractérisation des souris CHMP2Bintron5, un modèle d'étude du continuum SLA-DFT. Biologie moléculaire. Université de Strasbourg, 2014. Français. NNT : 2014STRAJ116 . tel-01260929

HAL Id: tel-01260929

<https://theses.hal.science/tel-01260929v1>

Submitted on 22 Jan 2016

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.

ÉCOLE DOCTORALE DE LA VIE ET DE LA SANTE

U1118 Mécanismes centraux et périphériques de la neurodégénérescence

THÈSE

 présentée par :

Aurélia VERNAY

soutenue le : 4 décembre 2014

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Aspect Cellulaire et Moléculaire de la Biologie

Mention Neurosciences

Caractérisation des souris CHMP2B^{intron5}, un modèle d'étude du continuum SLA-DFT

THÈSE dirigée par :

M. Jean-Philippe LOEFFLER

Mme. Frédérique RENE

Dr., Université de Strasbourg

Dr., Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Mme. Catherine BELZUNG

M. Yves GOLDBERG

Pr., Université de Tours

Dr., Université Joseph Fourier, Grenoble

AUTRES MEMBRES DU JURY :

M. Guy MENSAH-NYAGAN

Mme. Marie-Céline FLEURY-LESAUNIER

Mme. Isabelle LE BER

Pr., Université de Strasbourg

Dr., Hôpitaux universitaires de Strasbourg

Dr., Hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris

MEMBRE INVITE:

Mme. Chantal MATHIS

Dr. Université de Strasbourg

Remerciements

Je souhaiterais avant tout remercier chaleureusement le Dr Jean-Philippe Loeffler pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et m'avoir donné l'opportunité de réaliser ce doctorat. Je lui suis reconnaissante également pour son implication constante en tant que directeur de thèse et pour son soutien.

Je suis extrêmement reconnaissante envers ma directrice de thèse, le Dr Frédérique René, qui s'est énormément impliquée dans mon projet. Elle fut un guide, tant au niveau scientifique que technique. Ses connaissances étendues, sa rigueur et sa détermination ont été un exemple pour moi. Ce fut un plaisir de travailler à ses côtés, de débattre, d'apprendre et d'avancer.

Mes remerciements chaleureux vont également au Dr. Luc Dupuis, avec qui j'ai eu grand plaisir à travailler durant ma première année de doctorat. Son enthousiasme communicatif m'a toujours soutenue.

Je voudrais remercier les membres du jury, le Dr. Yves Goldberg, le Pr Catherine Belzung, le Pr Guy Mensah-Nyagan, le Dr. Marie-Céline Fleury-Lesaunier, le Dr. Isabelle Le Ber et le Dr. Chantal Mathis, qui m'ont fait l'honneur de lire et évaluer mon travail.

J'ai eu l'honneur et le plaisir de travailler en collaboration avec le Pr. Jean-Christophe Cassel et le Dr. Chantal Mathis. Je les remercie de m'avoir accueillie dans leurs locaux et d'avoir tout mis en œuvre pour me permettre de réaliser mes expériences dans les meilleures conditions. Je les remercie vivement pour le temps qu'ils m'ont consacré et pour m'avoir fait profiter de leur précieuse expertise.

Je tiens également à remercier le Dr. Jose-Luis Gonzalez De Aguilar, le Dr. Caroline Rouaux, le Dr. Alexandre Henriques et le Pr. Yves Larmet pour m'avoir aidée en tant que chercheurs expérimentés, pour leurs critiques constructives et leur apport scientifique. Je remercie également le Dr. François Sellal pour avoir partagé ses connaissances de scientifique et de clinicien, en particulier dans le cadre de l'écriture de la revue.

Je garderai toujours le souvenir de ces années passées aux cotés des autres doctorants du laboratoire: Hajer, Jelena, Pauline, Laura, Christine, Gina, ainsi que les anciens: Florent, Hussain, Yannick, ces compagnes et compagnons de galère, mais surtout de discussion, de travail et de détente. J'ai trouvé en Lavinia bien plus qu'une camarade mais une véritable amie. Nos liens resteront soudés par ces années de doctorat marquées par un esprit de "PRIDE and PLEASURE". Ce fut un plaisir de travailler aux cotés de Thiebault, Jérôme, Sylvie, Annie, Marie-Jo, Michelle et Brigitte. Je les remercie pour m'avoir toujours apporté leur aide lorsque j'en ai eu besoin, avoir partagé avec moi leur expérience et leurs connaissances, et pour tous les bons moments passés ensemble.

Je voudrais enfin remercier mes proches. Mes parents m'ont toujours soutenue et leurs encouragements ont été très précieux pour moi. Mon compagnon, Alexandre, en plus d'être un collègue dont j'ai apprécié la sagesse et l'intelligence, a été un soutien sans faille et indispensable. Enfin, je voudrais exprimer une pensée particulière pour ma fille, Ondine, dont les coups de pieds dynamiques m'ont encouragée tout au long de l'écriture de ce manuscrit.

Table des matières

Remerciements	2
Table des matières	4
Table des illustrations	6
Abréviations	7
Avant propos:	8
Introduction	9
I. Le syndrome SLA-DFT	10
A. Aspects cliniques.....	10
1. Aspects cliniques de la SLA	10
2. Aspects cliniques de la DFT.....	12
B. Arguments génétiques du continuum SLA-DFT	14
1. Les gènes communs à la SLA et la DFT	16
2. Gènes spécifiques de la SLA	20
3. Gènes spécifiques de la DFT	21
C. Physiopathologie du continuum SLA-DFT	23
1. Les agrégats protéiques	23
2. La mort des neurones	25
3. Neuro-inflammation.....	27
D. Les modèles de SLA et de DFT	30
1. Les modèles existants.....	30
2. Approches méthodologiques utilisées	35
3. Avantages et limites des modèles existants.....	37
4. Revue: Behavior evaluation in mouse models of bvFTD	39
II. CHMP2B	41
A. Rôle physiologique de CHMP2B	41
1. Présentation de CHMP2B	41
2. CHMP2B et le système ESCRT	42
3. CHMP2B, un acteur de l'autophagie	45
4. Rôle de CHMP2B et d'ESCRT dans l'exocytose	47
5. Rôle de CHMP2B et d'ESCRT dans la formation et la plasticité des épines dendritiques.....	47
B. CHMP2B et neurodégénérescence	48
1. Les mutations CHMP2B dans la SLA et la DFT	48
2. La mutation CHMP2B ^{intron5}	50
3. Le rôle de CHMP2B dans les maladies neurodégénératives	52
III. Problématique et objectif de thèse	52
Résultats	56
I. Publication 1: A transgenic mouse expressing CHMP2B^{intron5} mutant in neurons develops histological and behavioral features of Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Dementia	57
II. Etude des fonctions cognitives chez les souris CHMP2B^{intron5}	59
A. Matériel et méthodes	59
1. Stratégie expérimentale.....	59

2.	Test obscurité/lumière	60
3.	Tests de reconnaissance d'objets	60
4.	Labyrinthe de Barnes.....	61
5.	Labyrinthe de Barnes inversé	62
6.	Actimétrie	63
7.	Statistiques	63
8.	Etat d'inhibition des souris CHMP2B ^{intron5}	63
9.	Exploration d'objets	64
10.	Evaluation de la mémoire spatiale	68
11.	Mesure de l'inflexibilité comportementale.....	73
12.	Evaluation de l'activité des souris	75
III.	Publication 2: Full-length PGC-1α salvages the phenotype of a mouse model of human neuropathy through mitochondrial proliferation.....	77
Discussion	78
A.	Les souris CHMP2B ^{intron5} en tant que modèle de SLA.....	80
B.	Les souris CHMP2B ^{intron5} en tant que modèle de DFT	82
C.	Hypothèses sur les mécanismes mis en jeu.....	85
Bibliographie	88

Table des illustrations

Figure1: Génétique du syndrome SLA-DFT (Al-Chalabi et al., 2012).....	16
Figure 2 Représentation des inclusions pathologiques dans la SLA et la DFT (Ling et al., 2013).	24
Figure 3: structure de la protéine Vps2 (William Mike Henne et al., 2012).....	42
Figure 4 les complexes ESCRT (William M Henne, Buchkovich, & Emr, 2011).....	43
Figure 5 le système autophagique et son interaction avec le CMV (Rusten & Simonsen, 2008).	46
Figure 6: Répartition des mutations sur la protéine CHMP2B.....	48
Figure 7 schéma du protocole expérimental d'évaluation du comportement.....	60
Figure 8 Schéma du protocole d'exploration d'objets	61
Figure 9: Exploration lors du test obscurité/lumière des souris CHMP2B ^{intron5}	64
Figure 10 temps d'exploration des objets.....	66
Figure 11: Déplacement d'objet	67
Figure 12 Duplication d'objets.....	68
Figure 13 Apprentissage et mémoire dans le labyrinthe de Barnes	70
Figure 14 Stratégies sur le labyrinthe de Barnes.....	72
Figure 15: Répétition d'erreurs dans le labyrinthe de Barnes.....	73
Figure 16 Labyrinthe de Barnes inversé	74
Figure 17 Activité des souris sur trois jours.....	76

Abréviations

ADNmt	ADN mitochondrial
Alix	Apoptosis-Linked gene-2 Interacting protéine X
CHMP	CHarged Multivesicular body Protein
CMV	Corps MultiVésiculaire
DFT	Démence FrontoTemporale
EMG	ElectroMyoGraphie
ESCRT	Endosomal Sorting Complex Required for Transport
FUS	FUsed in Sarcoma
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein
IBMPFD	Inclusion Body Myopathy with Paget disease of the bones and Frontotemporal Dementia
JNM	Jonction NeuroMusculaire
LCR	Liquide CéphaloRachidien
MIM	Microtubule Interacting Motif
MN	MotoNeurone
PGRN	Progranuline
NMC	Neurone Moteur Cortical
SLA	Sclérose Latérale Amyotrophique
SNC	Système Nerveux Central
TDP-43	Transactivated response DNA binding Protein
UBQLN2	Ubiquiline 2
VCP	Valosin Containing Protein
VEN	Von EcoNomo

Avant propos:

La sclérose latérale amyotrophique (SLA) est une maladie neurodégénérative affectant les neurones moteurs corticaux et spinaux. Elle cause une faiblesse musculaire progressive conduisant à une paralysie et à la mort des patients 3 à 5 ans après le diagnostic. La démence frontotemporale (DFT) est la 2^e cause de démence pré-sénile. Cette maladie est le plus souvent associée à un changement de la personnalité avec des altérations du comportement social, tels qu'une désinhibition, une perte d'empathie, des comportements compulsifs et des changements d'habitudes alimentaires. Ces symptômes sont associés à une atrophie progressive des lobes frontaux et temporaux du cortex. Alors que la SLA et la DFT ont longtemps été considérées comme deux maladies différentes, les données cliniques, génétiques et histopathologiques montrent qu'elles appartiennent en fait à un même continuum, le syndrome SLA-DFT. Notamment, l'identification de mutations sur le gène CHMP2B chez des patients SLA et des patients DFT a été la première mise en évidence d'un lien génétique existant entre la SLA et la DFT.

La découverte de mutations responsables de SLA et de DFT sur différents gènes a permis le développement de modèles transgéniques de ces pathologies. Depuis la publication du premier modèle de SLA en 1994, leur nombre a explosé et il existe de nombreuses lignées exprimant différentes mutations ou invalidation d'un gène de façon ubiquitaire ou conditionnelle. L'étude de ces modèles a permis de grandes avancées dans la compréhension du syndrome SLA-DFT. Cependant, les mécanismes conduisant à la neurodégénérescence dans la SLA et la DFT ne sont toujours pas clairement établis. Afin d'étudier le continuum SLA-DFT, des souris transgéniques exprimant dans les neurones la mutation responsable de DFT CHMP2B^{intron5} ont été générées par le laboratoire qui m'a accueilli pour faire ma thèse..

L'objectif de mon travail de thèse a donc été de caractériser cette lignée transgénique à l'échelle moléculaire, cellulaire et intégrée. J'ai ainsi pu montrer que ces souris présentent des atteintes histologiques caractéristiques de la SLA et la DFT, des atteintes motrices et une maladie du motoneurones caractéristiques de la SLA, ainsi que des atteintes de types démence caractéristiques de la DFT.

Introduction

I. Le syndrome SLA-DFT

A. Aspects cliniques

1. Aspects cliniques de la SLA

La Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA) est une maladie neurodégénérative touchant les adultes. L'âge moyen de début de la maladie est de $61.8 \pm 3,8$ ans (Chiò et al., 2013). Elle se caractérise par la mort des neurones moteurs associée à une paralysie progressive des muscles squelettiques et entraîne la mort des patients moins de cinq ans après le diagnostic. En Europe, l'incidence de la SLA est de 2,1/100000/an, avec une légère prédominance des hommes par rapport aux femmes (Chiò et al., 2013). Cette incidence est comparable à celle de la sclérose en plaque, cependant, la survie étant beaucoup plus courte, la prévalence est bien moindre, avec 5,4 cas/100000, ce qui explique en partie que cette maladie est peu connue du grand public.

Les symptômes sont hétérogènes et varient en fonction du type de neurones moteurs qui sont touchés les premiers. Le système moteur est gouverné par deux types de neurones moteurs: les neurones moteurs corticaux (NMC) (ou supérieurs) et les motoneurones (MN) inférieurs. Les NMC sont situés dans le cortex moteur au niveau de la couche V et commandent le mouvement. Ces neurones projettent sur les MN inférieurs situés dans le bulbe rachidien et la corne ventrale de la moelle épinière, formant respectivement le tractus cortico-bulbaire et le tractus cortico-spinal également appelé tractus pyramidal. Les motoneurones inférieurs commandent directement le mouvement aux muscles qu'ils innervent. Dans la SLA, les premiers neurones touchés sont soit les NMC soit les MN, mais progressivement, au cours de la maladie, les deux types de neurones vont finalement être atteints. Les patients présentent donc des symptômes associés à la dégénérescence des MN, c'est à dire une faiblesse musculaire évoluant en une paralysie, un défaut de réflexes musculaires et une atrophie progressive des muscles. D'un point de vue clinique, l'atteinte motoneuronale est confirmée par la présence de fibrillations et de fasciculations en électromyographie. Selon le site primaire de l'atteinte neuronale, il est possible de distinguer deux formes de SLA: la forme

spinale, la plus courante qui représente deux tiers des cas, et la forme bulbaire. La forme bulbaire correspond à la dégénérescence des motoneurons bulbaires qui contrôlent entre autres les muscles de la face et de la bouche, donnant lieu à des difficultés d'élocution et de déglutition. La forme spinale correspond à la dégénérescence des MN spinaux et donne lieu à une faiblesse musculaire commençant généralement à l'extrémité des membres et se propageant progressivement jusqu'à atteindre les muscles respiratoires. Des symptômes pyramidaux sont de plus associés à l'atteinte des MNC. Ils se traduisent par la présence de spasticité et par l'inversion du réflexe de Babinsky. Quelle que soit la forme de départ de la maladie, celle-ci évoluera fatalement vers la paralysie des membres, du pharynx, du larynx, de la langue et finalement des muscles respiratoires entraînant la mort, vraisemblablement par arrêt respiratoire. Le déroulement temporel de la SLA est très variable en fonction des individus, allant de quelques mois à plus de 10 ans, mais la survie médiane est de 27 mois après l'apparition des symptômes et le taux de survie à 4 ans est de 41% (Zoccolella et al., 2008).

En plus de ces symptômes caractéristiques, la moitié des patients développent des signes de démence et environ 15% des patients présentent une démence Frontotemporale (DFT) (Ringholz et al., 2005).

D'un point de vue étiologique, la SLA peut être d'origine sporadique (90% des cas), ou d'origine familiale, mais la présentation clinique de la maladie est la même dans les deux cas. Dans les cas sporadiques l'influence de facteurs environnementaux a été recherchée mais jusqu'à présent aucun facteur environnemental ne permet d'expliquer la survenue de la maladie, excepté dans certaines populations très restreintes présentant une incidence anormalement élevée de SLA. Par exemple, la population de l'île de Guam, dans l'archipel des Mariannes, présente une incidence anormalement élevée de SLA (MULDER, KURLAND, & IRIARTE, 1954). Cela est vraisemblablement dû à une intoxication par un composé neurotoxique, le L-BMAA (L-Beta-Methylaminoalanine), produit par les noix de cycas, mangées par les chauves souris, elles-mêmes consommées par la population (P. A. Cox & Sacks, 2002). L'incidence de SLA dans cette population a d'ailleurs fortement diminué depuis la quasi-extinction de ces chauves souris sur l'île (P. A. Cox & Sacks, 2002).

Par contre des mutations délétères et des facteurs génétiques de prédisposition ont été découverts dans 22 gènes, aussi bien dans les formes familiales que dans les formes

sporadiques de SLA (Renton, Chiò, & Traynor, 2014), et seront développés dans le chapitre I. B. de l'introduction.

A ce jour, il n'existe pas de traitement curatif de la SLA. Le seul traitement existant est le Riluzole mais son action ne prolonge l'espérance de vie que de 3 mois (Miller, Mitchell, & Moore, 2012).

2. Aspects cliniques de la DFT

La démence frontotemporale (DFT) est une maladie neurodégénérative touchant les adultes et causant une démence. Elle est la deuxième cause de démence, après la maladie d'Alzheimer, dans la population pré-sénile. Sa prévalence est de 15/100000 parmi la catégorie d'âge 45-64 ans (Ratnavalli, Brayne, Dawson, & Hodges, 2002).

La DFT provoque des changements progressifs de la personnalité et du comportement et/ou des troubles de la parole. Ces symptômes sont associés à une atrophie dans les lobes frontaux et temporaux du cortex. On distingue trois types de DFT, selon les symptômes cliniques: le variant comportemental de la DFT (vcDFT), l'aphasie progressive et la démence sémantique.

L'aphasie progressive se manifeste tout d'abord par une difficulté à trouver ses mots. L'élocution devient difficile et hésitante à cause de problèmes d'articulation. Les patients éprouvent des difficultés dans la construction des phrases et la syntaxe assez tôt dans le décours de la maladie. Le langage devient haché, agrammatique avec un raccourcissement des mots (Harciarek & Cosentino, 2013).

La démence sémantique correspond à une perte du vocabulaire. Les patients perdent la signification de mots, ce qui les contraint à utiliser et répéter un vocabulaire de plus en plus restreint, tout en conservant une élocution fluide. Alors que la pathologie progresse, les patients deviennent bavards avec une désinhibition de la prise de parole et une persévération stéréotypée pour certaines thématiques (Harciarek & Cosentino, 2013).

Le vcDFT est le cas le plus fréquent. Il est défini par des atteintes progressives du comportement social, de l'alimentation et des fonctions exécutives (planification,

adaptation au changement). Les symptômes sont très hétérogènes entre les patients, de plus, aux stades précoces de la maladie, ils peuvent être confondus avec d'autres pathologies telles que la maladie d'Alzheimer, la schizophrénie ou la dépression (Pose et al., 2013). C'est pourquoi, en 2011, un consensus sur les critères de diagnostique du variant comportemental de la DFT a été publié (Rascovsky et al., 2011). Selon ce consensus, le premier critère est une détérioration progressive du comportement. Ensuite, six critères comportementaux sont évalués:

- Une désinhibition comportementale se manifestant soit par un comportement socialement inapproprié, soit par une perte des manières ou des convenances, soit par des actions impulsives ou irréfléchies.
- Une apathie ou une inertie.
- Une perte d'empathie se manifestant soit par une perte de sensibilité vis à vis des besoins et sentiments des autres personnes, soit par un désintérêt pour les relations sociales.
- Un comportement compulsif, stéréotypé ou persévératif se manifestant soit par la répétition de mouvements simples, soit par l'apparition de rituels ou d'un comportement stéréotypé complexe, soit par des stéréotypies verbales.
- Des changements alimentaires se manifestant soit par des changements de préférence alimentaire, soit par une glotonnerie, une surconsommation d'alcool ou de cigarettes, soit par la mise en bouche d'objets non comestibles.
- Un déficit des fonctions exécutives, avec une préservation de la mémoire épisodique et des capacités visuospatiales.

A cette étude des changements comportementaux s'ajoute l'étude par imagerie cérébrale: une atrophie des lobes frontaux et/ou temporaux doit être présente.

L'analyse par imagerie par résonance magnétique (IRM) des cerveaux de patients vcDFT montre une atrophie des lobes frontaux et temporaux du cortex ainsi que du cortex cingulaire antérieur, de l'insula antérieure et de zones sous-corticales comme le thalamus, l'amygdale ou l'hippocampe (Schroeter, Raczka, Neumann, & Yves von Cramon, 2007). Le profil d'atrophie est hétérogène et deux profils différents ont pu être distingués: une atteinte à prédominance frontale avec une atrophie restreinte au cortex frontal pouvant inclure le cortex temporal, et une atteinte à prédominance temporale avec une atrophie restreinte au cortex temporal ou incluant aussi le cortex frontal (Whitwell et al., 2009). L'aphasie progressive est associée à des aires d'atrophies dans le

lobe frontal inférieur gauche, l'insula et le cortex pré-moteur (Gorno-Tempini et al., 2004). La démence sémantique est associée à une atrophie asymétrique (le côté gauche étant généralement plus atrophié) des lobes temporaux, et particulièrement des aires antérieure et ventrale (Gorno-Tempini et al., 2004).

D'un point de vue étiologique, la DFT présente une composante héréditaire plus importante que la SLA, puisque la moitié des cas de DFT est d'origine familiale et l'autre moitié est d'origine sporadique. Neuf gènes portant des mutations responsables de DFT ont été identifiés à ce jour et sont impliqués dans 30% des cas. Ces gènes seront présentés dans le chapitre suivant de cette introduction.

Il n'existe pas de traitement curatif de la DFT, aussi, les efforts thérapeutiques se concentrent sur la limitation des symptômes. Agir sur les symptômes de la DFT est un enjeu important, d'une part pour la sécurité des patients qui se mettent en danger par leur comportement impulsif et leur défaut de jugement, d'autre part pour limiter le stress qui est très important parmi les proches et les accompagnants des patients. Les approches thérapeutiques sont basées sur les neurotransmetteurs dont le fonctionnement pourrait être altéré dans la DFT. Il a été montré que le fonctionnement de la sérotonine est altéré dans la DFT. Aussi, plusieurs inhibiteurs de la recapture de la sérotonine, dont la trazodone, ont montré un effet bénéfique sur la désinhibition, les stéréotypies et les troubles alimentaires (Lebert, Stekke, Hasenbroekx, & Pasquier, 2004). Bien que le système cholinergique soit plutôt préservé dans la DFT, des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase sont prescrits dans 40% des cas. La mémantine, un inhibiteur non compétitif des récepteurs NMDA, est également souvent prescrite (Bei Hu et al., 2010). Aucune étude n'a pourtant montré d'effet bénéfique de ces médicaments.

B. Arguments génétiques du continuum SLA-DFT

A ce jour, des mutations génétiques responsables de SLA ont été découvertes sur 22 gènes différents. Ces mutations permettent d'expliquer 68% des cas de SLA familiales et 11% des cas de SLA sporadiques. Le premier gène identifié, le gène de la superoxyde dismutase 1 (*SOD1*), fut découvert en 1993 et resta pendant presque 20 ans le seul gène

connu de la SLA. L'amélioration des techniques de séquençage a permis en quelques années la découverte de nombreux nouveaux gènes dont la pathogénicité est plus ou moins bien reconnue (tableau 1 et figure 1). Dans la DFT, des mutations causatives de la pathologie ont été identifiées dans 9 gènes et représentent 30% des cas (Ling, Polymenidou, & Cleveland, 2013). Six gènes ont été identifiés à la fois dans la SLA et la DFT et sont la preuve génétique du continuum entre ces deux pathologies. Dans la suite de ce chapitre, je présenterai ces gènes communs à la SLA et la DFT en mettant en avant leur fonction, puis ceux spécifiquement impliqués dans la DFT et terminerai par des gènes spécifiques de la SLA présentant le plus d'intérêt dans le cadre du continuum mécanistique existant entre SLA et DFT.

Tableau 1: Les gènes de la SLA et de la DFT. D'après (Ling et al., 2013)

gène (protéine)	fonction de la protéine	% fSLA	% sSLA	% DFT	pathologie	maladie
<i>SOD1</i>	enzyme de détoxification	20%	2%		SOD1	SLA
<i>FUS</i>	métabolisme des ARN	5%	<1%	<1%	FUS	SLA ou DFT
<i>TARDBP</i> (TDP-43)	métabolisme des ARN	5%	<1%	<1%	TDP-43	SLA ou DFT
<i>ANG</i> (Angiogenin)	activité angiogénique				TDP-43	SLA ou PD
<i>FIG4</i> (phosphoinositide phosphatase)	métabolisme des lipides					SLA
<i>OPTN</i> (Optineurin)	multifonction	4%	<1%		TDP-43	SLA
<i>VCP</i>	dégradation des protéines	<1%	<1%	<1%	TDP-43	SLA, DFT ou IBMPPD
<i>DAO</i> (D-amino acid oxydase)	métabolisme des acides aminés					SLA
<i>PFN1</i> (Profilin)	cytosquelette					SLA
<i>ATXN2</i> (Ataxin-2)	métabolisme des ARN	facteur de risque			TDP-43	SLA
<i>HNRNPA1</i>	métabolisme des ARN					SLA
<i>HNRNPA2B1</i>	métabolisme des ARN					SLA
<i>SQSTM1</i> (p62)	dégradation des protéines					SLA, PDB
<i>EWSR1</i> (Ewing sarcoma break region 1)	métabolisme des ARN					SLA
<i>TAF15</i> (TBP-associated factor)	métabolisme des ARN					SLA
<i>ALS2</i> (Alsin)	trafic vésiculaire					SLA juvénile
<i>SPG11</i> (Spatacsin)	transport axonal					SLA
<i>SETX</i> (Senataxin)	métabolisme des ARN					SLA
<i>VAPB</i> (VAMP-associated protein)	trafic vésiculaire					SLA, AMS
<i>C9ORF72</i>	dégradation des protéines	25%	5%	10%	TDP-43	SLA, DFT
<i>SIGMAR1</i> (non-opioid receptor 1)	transduction du signal					SLA
<i>UBQLN2</i>	dégradation des protéines	<1%		<1%	TDP-43 FUS	SLA, DFT
<i>MAPT</i>	cytosquelette			10%	tau	DFT
<i>PGRN</i>	inflammation			10%	TDP-43	DFT
<i>CHMP2B</i>	trafic vésiculaire	<1%		<1%	p62	SLA, DFT
<i>TMEM106B</i> (transmembrane protein 106B)	fonction lysosomale			facteur de risque	TDP-43	DFT

PDB= Paget Disease of Bones = maladie des os de Paget. AMS= Atyotrophie Spinale.

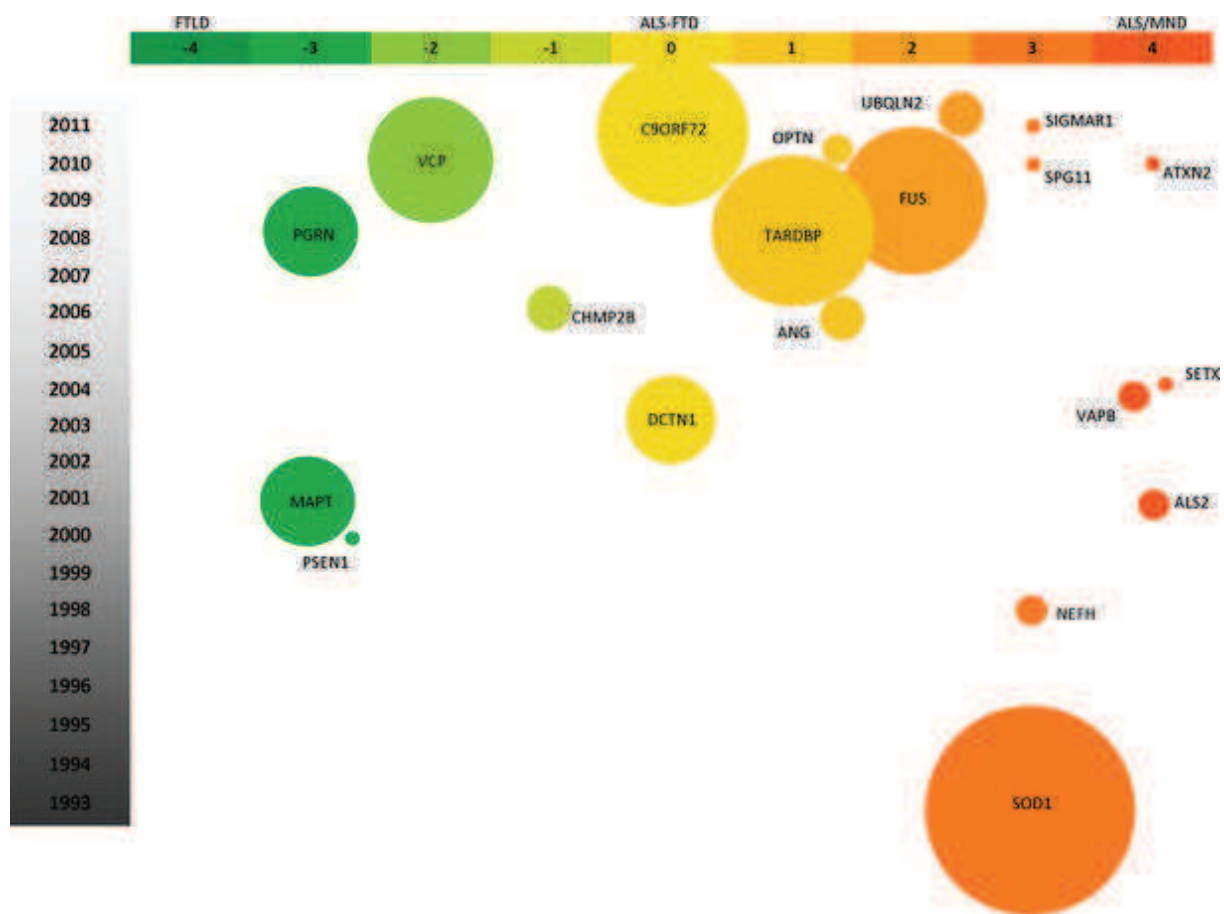


Figure 1: Génétique du syndrome SLA-DFT (Al-Chalabi et al., 2012).

La couleur des cercles et leur place sur l'axe horizontal représentent la proportion de mutations sur un gène dans la SLA (rouge) ou la DFT (vert). Le placement sur l'axe vertical représente l'année de découverte de l'implication du gène dans la SLA ou la DFT. La taille du cercle représente l'intérêt pour ce gène porté par la recherche, basé sur le nombre de publications.

1. Les gènes communs à la SLA et la DFT

Six gènes sont associés à la fois à la SLA et la DFT. Ils sont associés à deux grandes catégories de fonction cellulaire: l'homéostasie protéique et le métabolisme des ARN. En effet, *C9ORF72*, Charged Multivesicular Body Protein 2B (*CHMP2B*), Valosin Containing Protein (*VCP*) et Ubiquilin 2 (*UBQLN2*) sont associés à l'autophagie et au protéasome. Les gènes TransActivated Response DNA Binding Protein (*TARDBP*) et Fused in Sarcoma (*FUS*) sont associés au métabolisme des ARN.

a) *Les gènes de l'homéostasie protéique*

Les maladies neurodégénératives ont toutes pour point commun l'accumulation d'inclusions protéiques dans les neurones. Bien que l'effet pathogène ou au contraire protecteur de ces inclusions soit toujours débattu, il est clair que l'homéostasie protéique est un acteur majeur dans l'ensemble des maladies neurodégénératives. De nombreuses études ont démontré l'effet neurotoxique d'un dysfonctionnement ou d'une surcharge des deux voies de dégradation des protéines: le protéasome et l'autophagie. Dans les cas de la SLA et la DFT, cette idée est renforcée par la découverte de plusieurs mutations sur des gènes directement impliqués dans la régulation de la dégradation protéique. Trois gènes communs à la SLA et la DFT ont un rôle dans la dégradation protéique: *CHMP2B*, *VCP* et *UBQLN2*. La fonction de *C9ORF72* n'est pas déterminée de façon certaine mais une étude récente publiée en 2014 a montré une localisation de la protéine avec l'autophagosome (Farg et al., 2014).

(1) *CHMP2B*

La protéine CHMP2B appartient au complexe ESCRT (Endosome Sorting Complex Required for Transport) qui intervient dans la voie endo-lysosomale de dégradation des protéines et dans l'autophagie. Des mutations sur CHMP2B ont à l'origine été découvertes dans des familles de DFT ainsi que dans des cas sporadiques, puis des mutations ont également été découvertes chez des patients SLA et SLA-DFT (Isaacs, Johannsen, Holm, & Nielsen, 2011). Le sujet de cette thèse étant la caractérisation d'un modèle basé sur l'expression d'une de ces mutations, les mutations CHMP2B ainsi que les fonctions de la protéine font l'objet de la deuxième partie de cette introduction et ne seront donc pas développées ici.

(2) *VCP*

La protéine VCP est impliquée dans des fonctions cellulaires aussi diverses que la régulation du cycle cellulaire, le fonctionnement mitochondrial, le réassemblage membranaire, ainsi que la dégradation protéique associée au réticulum endoplasmique, au protéasome et à l'autophagie (Kunitoshi Yamanaka, Sasagawa, & Ogura, 2012). VCP est une AAATPase de type II (ATPase Associée à diverses Activités cellulaires) possédant deux domaines ATPases D1 et D2 et un domaine N-terminal responsable de la liaison aux substrats et aux co-facteurs. VCP est active sous forme d'hexamère en forme de double anneau et est une chaperonne agissant sur les protéines ubiquitinées et

permettant leur adressage vers le protéasome ou la voie autophagique. Des mutations sur Valosin Containing Protein (VCP) ont été historiquement découvertes comme la cause de la myopathie à corps d'inclusions associée à la maladie des os de Paget et à la démence frontotemporale (IBMPFD) (Watts et al., 2004). Des mutations chez 2% des patients SLA ont été découvertes ensuite, et certaines mutations sont communes entre SLA et IBMPFD (Johnson et al., 2010). Les mutations sont principalement localisées au niveau du domaine D1 et du domaine N-terminal de la protéine. Les mutations sur VCP restent une cause relativement rare de la maladie, puisqu'elles représentent 1 à 2% des cas de SLA et moins de 1% des DFT. Les mutations VCP causent des SLA et DFT à inclusions TDP-43 positives.

(3) *UBQLN2*

UBQLN2 appartient à la famille des protéines de type "ubiquitin like". Elle a pour rôle de conduire les protéines ubiquitinées vers le protéasome, grâce à un domaine N-terminal "ubiquitin-like" se fixant au protéasome et à un domaine C-terminal de liaison à l'ubiquitine. De plus UBQLN2 régule l'activité autophagique en se liant à la protéine LC3 (Rothenberg et al., 2010). Des mutations sur UBQLN2 sont de rares causes de SLA et de SLA-DFT. Les mutations sont localisées sur les sites C-terminal et N-terminal de la protéine. L'expression de deux mutations DFT dans une lignée cellulaire neuronale inhibe le protéasome (Deng et al., 2011). Des inclusions contenant de l'ubiquitine et UBQLN2 ont été observées chez les patients porteurs de mutations, mais ces inclusions étaient également positives pour TDP-43, FUS et optineurine (Deng et al., 2011). De plus UBQLN2 a été observée dans les inclusions pathologiques de patients SLA non porteurs de mutation UBQLN2, suggérant une place importante de la protéine dans les mécanismes de neurodégénérescence.

(4) *C9ORF72*

La fonction de la protéine codée par C9orf72 est encore hypothétique cependant, des travaux récents montrent qu'elle aurait un rôle dans le trafic endosomal et l'autophagie. L'équipe de Farg et al. a montré que dans des cultures de neurones C9ORF72 co-localise avec la protéine de l'autophagie LC3 et interagit avec UBQLN2. De plus l'inhibition de C9ORF72 dans ces neurones altère l'endocytose et l'autophagie (Farg et al., 2014).

La récente découverte de l'implication du gène C9ORF72 fut une grande avancée dans la génétique de la SLA et de la DFT. La répétition de la séquence hexanucléotidique GGGGCC un grand nombre de fois (700 à 1600 copies) dans une région non codante du gène est la cause la plus fréquente de SLA, de DFT et de SLA-DFT. Cette expansion hexanucléotidique est responsable de 80% des cas familiaux de SLA-DFT, de 20 à 50% des cas familiaux de SLA et de 20 à 30% des cas de DFT. Plusieurs hypothèses concernant la pathogénicité de la mutation ont émergées: L'une est l'accumulation toxique d'ARN de C9ORF72, comme c'est le cas dans d'autres maladies à expansions nucléotidiques (notamment la dystrophie myotonique 1 et le syndrome de l'X fragile). En effet des agrégats intranucléaires d'ARN contenant la répétition hexanucléotidique ont été détectés chez des patients. Une autre hypothèse est la toxicité due à l'accumulation de peptides issus de la traduction ATG-indépendante de la répétition hexanucléotidique (Mori et al., 2013). Enfin, une dernière hypothèse serait une perte de fonction de la protéine codée par *C9ORF72* entraînant une altération de la voie autophagique, comme le suggère l'étude de Farg et collègues (Farg et al., 2014). Les patients développent des inclusions contenant TDP-43 et p62. D'un point de vue clinique, il a été rapporté que les patients porteurs de cette expansion sont plus susceptibles de développer la forme bulbaire de la SLA, avec des atteintes cognitives plus précoces que chez les non porteurs. De plus, le développement de la pathologie est plus rapide que chez les patients non porteurs de la mutation.

b) Les gènes du métabolisme des ARN

Des mutations découvertes dans deux gènes impliqués dans le métabolisme des ARN, *TARDBP* et *FUS*, à la fois dans des cas de SLA et de DFT renforcèrent le lien entre ces pathologies.

L'intérêt porté à ces gènes est renforcé par le fait que des inclusions contenant TDP-43 ou FUS sont fréquentes dans les biopsies de patients SLA et DFT. 97% des cas de SLA et 45% des cas de DFT présentent des inclusions positives pour TDP-43, et certains cas de SLA (<1%) ainsi que 9% des cas de DFT présentent des inclusions positives pour FUS (Ling et al., 2013).

(1) *TARDBP*

Le gène *TARDBP* code pour la protéine TDP-43, une protéine à localisation nucléaire impliquée dans différentes étapes du métabolisme de l'ARN, incluant la transcription, l'épissage, le transport et la traduction. Plus de 40 mutations de TDP-43 ont été trouvées chez 5% des patients SLA et dans de rares cas de DFT. Ces mutations sont principalement localisées sur la région C-terminale de la protéine, riche en glycine, impliquée dans la liaison aux ARNs (Lagier-Tourenne, Polymenidou, & Cleveland, 2010; Mackenzie, Rademakers, & Neumann, 2010). Chez les patients SLA et DFT, la localisation sub-cellulaire de TDP-43 est altérée et TDP-43 est retrouvée soit dans le noyau sous forme d'inclusion, soit exclu du noyau, dans des inclusions cytoplasmiques. Ces inclusions ont été retrouvées à la fois dans les neurones et les astrocytes. L'exclusion de TDP-43 du noyau des neurones chez les patients suggère une perte d'une ou plusieurs des fonctions nucléaires de TDP-43 dans le processus pathologique.

(2) *FUS*

FUS appartient à la famille des "multifunctional DNA/RNA binding protein". Cette protéine est impliquée dans la réparation de l'ADN, la transcription et le transport des ARNm. Sa localisation est à la fois nucléaire et cytoplasmique avec des aller et retours constants entre ces deux compartiments (Dormann & Haass, 2013).

Plus de 30 mutations sur *FUS* ont été identifiées chez des patients SLA et de rares patients DFT. Ces mutations sont localisées soit dans le domaine de type prion soit dans le domaine de signal de localisation nucléaire de *FUS* (Lagier-Tourenne et al., 2010; Mackenzie et al., 2010). Les mutations *FUS* sont associées à des SLA précoces, voire juvéniles pour certaines. Chez les patients, la protéine forme des inclusions nucléaires et cytoplasmiques dans les neurones et les astrocytes. Ces inclusions sont négatives pour TDP-43. Bien qu'aucune interaction entre *FUS* et TDP-43 n'ait été montrée, ces deux protéines ont des rôles similaires dans le métabolisme des ARN et pourraient avoir des cibles communes.

2. Gènes spécifiques de la SLA

a) *Superoxyde dismutase 1 (SOD1)*

La *SOD1* est une enzyme de détoxification radicalaire qui assure la protection de la cellule contre le stress oxydant en métabolisant les radicaux superoxydes en peroxyde

d'hydrogène. L'identification en 1993 de 11 mutations sur le gène SOD1 (Cu/Zn Superoxyde Dismutase1) dans des SLA familiales a constitué la première découverte d'une cause génétique de la SLA (Rosen et al., 1993). A ce jour, plus de 170 mutations ont été identifiées, représentant 20% des cas de SLA familiales et 2% des cas de SLA sporadiques (ALSoD Consortium; <http://alsod.iop.kcl.ac.uk/>). Des mutations du gène codant la SOD1 sont donc la deuxième cause génétique de SLA, derrière C9orf72. Les patients porteurs de mutations sur SOD1 développent des inclusions protéiques dans les neurones et les astrocytes, lesquelles sont positives pour l'ubiquitine et SOD1 mais sont négatives pour TDP-43 et FUS. Des études fonctionnelles ont mis en évidence divers dysfonctionnement cellulaire qui pourraient être les causes de la neurodégénérescence liée aux mutations du gène *SOD1*. Parmi eux figurent l'exitotoxicité du glutamate, le dysfonctionnement mitochondrial, l'axonopathie et l'altération du trafic endosomal. La pathogénicité des mutations dans la SOD1 semble être dû à un gain de fonction de la protéine mutée, comme l'indiquent les modèles animaux et cellulaires (Reaume et al., 1996; Rotunno & Bosco, 2013).

b) *Sequestrosome 1 (SQSTM1)*

SQSTM1 code pour la protéine p62. Cette protéine possède un site de liaison à l'ubiquitine et se lie à LC3, une protéine clé de l'autophagie, ce qui lui confère un rôle de récepteur des cargos poly-ubiquitinés pour l'autophagie. De rares mutations sur le gène *SQSTM1* ont été découvertes chez des patients SLA et DFT. Des mutations dans *SQSTM1* causent également la maladie des os de Paget. Ainsi, la pathogénicité des mutations dans *SQSTM1* pourrait se faire via un dysfonctionnement de l'autophagie (Rea, Majcher, Searle, & Layfield, 2014). De plus, p62 est retrouvée dans les inclusions pathologiques présentes dans les neurones des patients SLA et DFT, ce qui renforce l'idée du rôle prépondérant de la fonction autophagique dans la neurodégénérescence associée à la pathologie.

3. Gènes spécifiques de la DFT

a) *Microtubule Associated Protein Tau (MAPT)*

Le gène *MAPT* code pour la protéine tau, une protéine associée aux microtubules qui, en se liant aux dimères de tubuline permet la polymérisation et la stabilité des microtubules dans la cellule. Tau régule l'élongation et le raccourcissement des

microtubules et cette fonction est modulée par le nombre de domaines de liaison aux microtubules (trois ou quatre) sur tau, déterminé par un épissage alternatif (Panda, Samuel, Massie, Feinstein, & Wilson, 2003). Des mutations sur le gène *MAPT* sont à l'origine de 10% des démences frontotemporales (Rademakers, Neumann, & Mackenzie, 2012). Les patients porteurs de mutations sur tau développent une DFT associée à du parkinsonisme. Les mutations sur tau sont de deux types: des mutations faux sens affectant la séquence d'acides aminés de la protéine, ou des mutations introniques sur le site d'épissage de l'exon 10, modifiant l'épissage alternatif de l'ARN de *MAPT* et favorisant le variant à 4 sites de liaison aux microtubules (Hutton et al., 1998). Cette dominance du variant à 4 sites de liaison perturbe l'interaction de tau avec la tubuline et abouti à l'accumulation de tau hyperphosphorylée toxique.

b) Progranuline (PGRN)

La progranuline est une glycoprotéine qui fonctionne potentiellement comme un facteur de croissance autocrine. La fonction physiologique de la PGRN est pour le moment mal comprise, mais des mutations homozygotes du gène *PGRN* causent une lipofuscinose neuronale, une pathologie liée au dysfonctionnement du lysosome. Ceci suggère un rôle de la PGRN dans le fonctionnement du lysosome et un mécanisme potentiel dans les DFT liées à la PGRN. Par ailleurs, la PGRN a un rôle dans la neuro-inflammation (Ahmed, Mackenzie, Hutton, & Dickson, 2007). Des mutations dans le gène de la *PGRN* sont fréquentes et sont retrouvées dans 10% des cas de DFT. Plus de 60 mutations réparties tout au long du gène ont été identifiées (Nguyen, Nguyen, Martens, Mitic, & Farese, 2013). La plupart des mutations causent l'apparition précoce d'un codon stop entraînant la dégradation de l'ARNm et rendant l'allèle porteur de la mutation non fonctionnel. Les patients DFT sont hétérozygotes pour la mutation et souffrent d'une haploinsuffisance de la PGRN. D'un point de vue histopathologique, les mutations sur la PGRN causent des inclusions neuronales positives pour l'ubiquitine et TDP-43.

C. Physiopathologie du continuum SLA-DFT

1. Les agrégats protéiques

Comme de nombreuses autres maladies neurodégénératives, la SLA et la DFT sont caractérisées par la formation d'inclusions protéiques dans les neurones (Blokhuys, Groen, Koppers, van den Berg, & Pasterkamp, 2013). Ces inclusions se différencient entre les patients par leur composition protéique, déterminée en partie par les mutations. Les protéines détectées dans les agrégats en fonction des gènes mutés chez les patients atteints de SLA sont présentés dans le tableau x, issu de la revue de Blokhuys et collègues (Blokhuys et al., 2013).

Tableau 2: composition des agrégats dans la SLA. (Blokhuys et al., 2013)

	Ub	p62	SOD1	TDP-43	FUS	OPTN	UBQLN2	ATXN2	C9ORF72	Autres protéines	Colocalisation dans les mêmes inclusions
SALS	+	+	-	+	±	+	+	+	-	VCP TAF15 PDI RGNEF, Peripherin, pNFH RBM45	TDP-43 and FUS FUS and ATXN2 OPTN and TDP-43 TDP-43 and PABP1 and TIA-1 TDP-43 and RBM45
ALS SOD1	+	+	+	-	-	±	+	NR	+		
ALS VCP	NR	NR	NR	+	NR	NR	NR	NR	NR		
ALS VAPB	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR		
ALS TDP-43	+	+	-	+	+	+	+	NR	-	RGNEF, Peripherin, pNFH	
ALS FUS	+	+	-	±	+	±	+	+	-	PDI RGNEF, Peripherin, pNFH	FUS and ATXN2 FUS and PABP1
ALS OPTN	+	+	-	+	NR	±	NR	NR	NR		
ALS UBQLN2	+	+	-	+	+	+	+	NR	NR		
ALS C9ORF72	+	+	-	+	NR	+	+	NR	-	DPR ² RGNEF, Peripherin, pNFH, RBM45	p62 and DPR

DPR dipeptide repeat proteins, pNFH phosphorylated high molecular weight neurofilament, NR not reported, + les agrégats sont immunopositifs pour la protéine considérée, - les agrégats sont immunonégatifs pour la protéine considérée. ²Les inclusions négatives pour TDP-43, positives pour p62, UBQLN2 et DPR montrent une distribution spécifique dans le cervelet et l'hippocampe chez les patients porteurs de la répétition.

Les SLA et les DFT peuvent être classées en fonction du type d'inclusions observées chez les patients, cependant, dans la majorité des cas il n'est pas possible de relier un type d'inclusions à un phénotype clinique particulier. Les observations histopathologiques réalisées *post-mortem* peuvent permettre de confirmer *a posteriori*

un diagnostique de SLA ou de DFT. Dans la SLA, la présence d'inclusions protéiques dans les motoneurones est un marqueur caractéristique de la maladie. Cependant, ces inclusions sont également présentes dans d'autres zones du système nerveux central, notamment les lobes frontaux et corticaux du cortex, l'hippocampe et le cervelet (Al-Chalabi et al., 2012). L'ubiquitine est un marqueur commun à la majorité des types d'inclusions de la SLA et la DFT. La protéine p62 est également retrouvée dans les inclusions de façon systématique (Arai et al., 2003). Ces deux protéines étant impliquées dans la voie de dégradation du protéasome et de l'autophagie, ceci indique une implication de ces voies de dégradation dans les mécanismes de neurodégénérescence dans la SLA et la DFT. Comme illustré sur la figure 2, l'immense majorité des cas de SLA (97%) et un peu moins de la moitié des cas de DFT (45%) présentent des inclusions positives pour TDP-43. La découverte en 2006 de la présence de TDP-43 dans les agrégats cytoplasmiques à la fois dans la SLA et la DFT fut la première indication d'un mécanisme pathologique commun entre ces deux maladies (Neumann et al., 2006). Les inclusions FUS, quant à elles représentent 1% des SLA et 9% des DFT. Avec l'ubiquitine et p62, les inclusions de TDP-43 et FUS représentent ainsi le continuum histopathologique entre SLA et DFT. Pour la SLA, un troisième type d'inclusions est caractérisé par la présence de SOD1, retrouvée uniquement chez les patients porteurs de mutations sur son gène. De plus, une minorité de patients présentent des inclusions positives à l'ubiquitine dans lesquelles ni TDP43 ni FUS ne sont détectées. Dans les DFT, des inclusions contenant la protéine tau hyperphosphorylée sont retrouvées dans 45% des cas, les 55% des cas restant étant des cas présentant des inclusion contenant de l'ubiquitine associée ou non à TDP43 ou FUS. Les patients présentant des inclusions où seule l'ubiquitine est détectées ne représentent que 1% des cas.

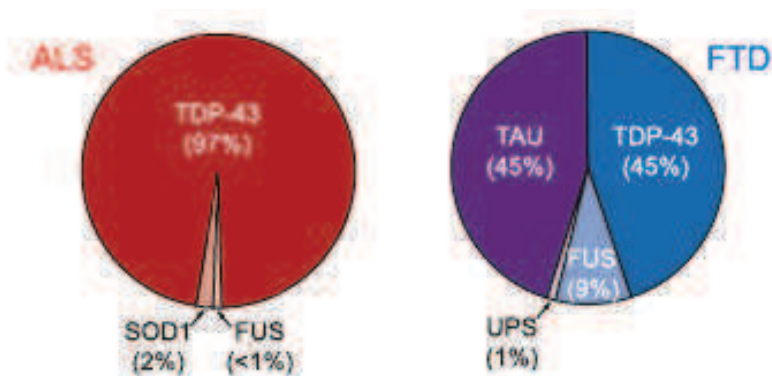


Figure 2 Représentation des inclusions pathologiques dans la SLA et la DFT (Ling et al., 2013).

Les inclusions TDP-43 et FUS forment un lien histopathologique entre la SLA et la DFT.

2. La mort des neurones

La mort des motoneurones fut le premier phénomène histopathologique décrit dans la SLA. En effet, le médecin Jean-Martin Charcot décrivit en 1874 la SLA comme une atrophie de la zone ventrale de la moelle épinière. Il sera montré plus tard que cette atrophie est due à la dégénérescence des motoneurones présents dans la corne ventrale de la moelle épinière. A ce jour, les mécanismes pathologiques à l'origine de cette neurodégénérescence ne sont pas connus. Plusieurs hypothèses sur les causes pathologiques ont été proposées, notamment un stress oxydant, la toxicité du glutamate, un dysfonctionnement mitochondrial, un défaut de transport axonal, un défaut de dégradation des protéines ou un défaut de traitement des ARN. Le rôle d'un dysfonctionnement mitochondrial a été étudié, suite à l'observation dans les motoneurones et les muscles de patients SLA de mitochondries vacuolisées et enflées (Afifi, Aleu, Goodgold, & MacKay, 1966; Sasaki & Iwata, 2007). Un défaut du transport axonal est également une cause possible de la neurodégénérescence. Un élargissement des axones des MNC (Okamoto, Hirai, Shoji, Senoh, & Yamazaki, 1990) et des MN (Sasaki & Maruyama, 1992) est présent chez les patients SLA. De plus, un défaut de transport axonal est un événement précoce dans la pathologie développée par les modèles murins de SLA (Zhang, Tu, Abtahian, Trojanowski, & Lee, 1997). Enfin, des mutations sur la sous unité p150 de la dynactine, le moteur du transport axonal rétrograde, sont un facteur de risque de SLA (Münch et al., 2004). L'hypothèse d'un rôle du dysfonctionnement des systèmes de dégradation des protéines est portée par l'accumulation d'agrégats protéiques dans le cerveau et la moelle épinière des patients. De plus, ces agrégats contiennent des protéines clés de la dégradation protéiques: des chaperonnes (notamment VCP), l'ubiquitine et des régulateurs de la fonction autophagique (p62, CHMP2B, UBQLN2), et ceci est vrai à la fois chez les patients porteurs de mutations sur ces gènes, mais aussi chez les patients non-porteurs. D'un point de vue fonctionnel, l'inhibition du protéasome provoque des agrégats cytoplasmiques de TDP-43 dans des neurones corticaux en culture (van Eersel et al., 2011). De plus, elle provoque la mort des MN, une astrocytose dans la moelle épinière et des atteintes motrices dans un modèle d'extinction conditionnelle dans les MN de la sous unité Rpt3 du protéasome (Tashiro et al., 2012). Chez la souris, l'inhibition de l'autophagie dans les neurones par extinction

conditionnelle du gène *Atg5* (Autophagy related 5) provoque des inclusions neuronales, une neurodégénérescence et des atteintes motrices (Hara et al., 2006).

Alors que la mort des motoneurones a longtemps été considérée comme la cause unique de la SLA, il est aujourd'hui admis que d'autres cellules participent à la maladie, notamment les astrocytes et les microglies, mais également les cellules musculaires squelettiques. Le rôle des astrocytes dans la SLA a été démontré dans des modèles *in vitro* basés sur la mise en culture de motoneurones sains en présence d'astrocytes exprimant une SOD1 mutée, issus de patients (Marchetto et al., 2008) ou de souris transgéniques modèles de la SLA (Nagai et al., 2007). Les astrocytes exprimant la SOD1 mutée induisent la mort des motoneurones via la sécrétion de facteurs toxiques. Cet effet délétère des astrocytes sur les motoneurones a été confirmé avec des astrocytes issus de patients SLA non porteurs de mutation sur la SOD1 (Haidet-Phillips et al., 2011), montrant que la toxicité des astrocytes dans la SLA est un processus général et non spécifique aux patients porteurs de mutations sur la SOD1. Par ailleurs, le muscle apparaît comme un tissu acteur de la pathologie (Dupuis & Echaniz-Laguna, 2010). Cette hypothèse est soutenue par le fait que le muscle exerce une influence directe sur le neurone qui l'innervé (Chakkalakal, Nishimune, Ruas, Spiegelman, & Sanes, 2010). De plus un hypermétabolisme spécifiquement musculaire induit une dénervation partielle et une maladie du motoneurone (Dupuis et al., 2009). L'expression de deux mutations sur la SOD1 (G37R et G93A) ainsi que la surexpression de la SOD1 sauvage humaine dans le muscle de souris induit une atrophie musculaire, ainsi qu'une dégradation des JNM, une axonopathie et une dégénérescence des MN (Wong & Martin, 2010).

Dans la DFT, l'atrophie massive des lobes frontaux et temporaux suggère une perte massive de neurones et/ou de cellules gliales. Un seul type de neurones dégénératifs dans la DFT a été identifié, il s'agit des neurones Von Economo (VEN). Cette dégénérescence sélective a été découverte récemment dans un petit groupe de patients atteints de forme sporadique de DFT et présentant une histopathologie de type FTD-tau ou FTD-U. Les auteurs montrent une perte de 74% de neurones Von Economo par rapport à des sujets contrôles (Seeley et al., 2006). Ils montrent également qu'il n'y a pas de perte de ces neurones chez des patients atteints de la maladie d'Alzheimer, montrant ainsi que cette perte est spécifique de la DFT. La perte des neurones VEN chez les patients DFT a été confirmée dans deux autres études. Par contre, ces études montrent

une perte également chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer, bien que moins importante (A F Santillo, Nilsson, & Englund, 2013; Alexander F Santillo & Englund, 2014). La perte des neurones VEN a été observée chez des patients à des stades précoces de DFT, suggérant que ces neurones sont parmi les premières cibles de la maladie. Les neurones VEN sont de larges neurones bipolaires présents dans la couche V du cortex cingulaire antérieur. Ils représentent environ 5% des neurones de cette aire (Nimchinsky, Vogt, Morrison, & Hof, 1995). Ces neurones ont été découverts chez les humains et les grands singes mais ils existent aussi chez certains autres grands mammifères. A ce jour, la fonction exacte de ces neurones n'est pas connue, mais leur grande taille suggère une conductivité rapide de leurs axones. De plus, il a été montré que les neurones VEN projettent dans d'autres zones du cerveau, même si les aires de projection ne sont pas déterminées (Nimchinsky et al., 1995). Enfin, leur localisation dans le cortex cingulaire antérieur et leur distribution dans la phylogénie suggère un rôle dans les interactions sociales complexes, telles que la capacité à reconnaître les émotions d'autrui (théorie de l'esprit ou theory of mind) ou l'intuition.

Il est intéressant de noter que dans la SLA comme dans la DFT, les neurones touchés sont de larges neurones de la couche V du cortex, présentant de longues projections axonales.

3. Neuro-inflammation

La neuro-inflammation est caractérisée par l'activation des cellules gliales microglies et astrocytes, la libération de facteurs inflammatoires tels que les cytokines et l'infiltration de cellules immunitaires dans le LCR lorsque la barrière hémato-encéphalique est lésée. Les microglies sont les principales cellules de l'inflammation du SNC et sont considérées comme les macrophages du SNC. Leur activation conduit à leur prolifération, un changement de morphologie, l'expression de cytokines, une forte mobilité et une capacité accrue de phagocytose. Les astrocytes ont un rôle de support des neurones, notamment dans la formation et le maintien synaptique, le recyclage des neurotransmetteurs ou l'apport énergétique. Mais ces cellules sont également des acteurs de la neuro-inflammation. L'activation des astrocytes se traduit par une prolifération, une migration vers la zone lésée et une sur-expression de la Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP).

La présence de neuro-inflammation dans la SLA fut mise en évidence par le marquage d'astrocytes activés dans le cerveau de patients en 1991 (Murayama, Inoue, Kawakami, Bouldin, & Suzuki, 1991), puis sur des coupes de moelle épinière de patients (Kawamata, Akiyama, Yamada, & McGeer, 1992). Ces publications furent suivies par la découverte d'infiltrats lymphocytaires et leukocytaires dans le système nerveux central des patients SLA (Engelhardt, Tajti, & Appel, 1993; McGeer & McGeer, 2002). De plus, une surexpression des gènes de l'inflammation a été observée dans les cerveaux de patients SLA comparés à des cerveaux contrôles (McGeer & McGeer, 2002). Toutes ces études ayant été réalisées sur des tissus prélevés post-mortem, c'est à dire au stade final de la maladie, il n'est pas possible de déterminer si cette neuro-inflammation est une conséquence de la mort des motoneurones ou au contraire si elle participe au processus de neurodégénérescence. Seul un cas de patient décédé accidentellement à un stade précoce de SLA a pu être examiné (Fischer et al., 2004). Ce patient présentait une dénervation musculaire ainsi qu'une axonopathie, mais ne présentait pas de dégénérescence de motoneurones de la moelle épinière, ni d'activation astrocytaire. Bien qu'il s'agisse d'un cas isolé, cette étude suggère que l'activation astrocytaire observée en stade terminal chez les patients n'est pas un phénomène précoce. Il a par contre été montré une corrélation négative entre la quantité de lymphocytes et la progression de la maladie chez des patients (Beers et al., 2011).

L'étude des modèles transgéniques de SLA indique un rôle actif des astrocytes et des microglies dans la neurodégénérescence. Tout d'abord, une surexpression de marqueurs d'inflammation, notamment TNF-alpha (Tumor Necrosis Factor-alpha) et GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein) a été rapportée dans la moelle épinière des souris SOD1 G93A (le principal modèle de SLA) à un stade précédant la mort des motoneurones (Yoshihara et al., 2002). Ensuite, une étude publiée en 2006 utilisant un modèle de SLA basé sur l'expression conditionnelle de la mutation SOD1 G37R montre qu'une diminution d'expression de la SOD1 mutée spécifiquement dans les microglies augmente la survie des souris (Boillée et al., 2006). La même équipe montra qu'une diminution de l'expression de la SOD1 mutée dans les astrocytes augmente également la survie des souris (Koji Yamanaka et al., 2008). Dans ces deux modèles de sauvetage conditionnel des microglies ou des astrocytes, les auteurs montrent que ces cellules "en bonne santé" sont activées et ralentissent la progression de la pathologie. De plus, un rôle bénéfique des lymphocytes par l'activation des microglies et des astrocytes dans le

SNC des souris SOD1 G93A a été démontré (Beers, Henkel, Zhao, Wang, & Appel, 2008), indiquant un rôle protecteur de la neuro-inflammation dans un modèle de SLA. Des études cliniques ciblant la neuro-inflammation ont été réalisées mais n'ont, à ce jour, pas donné de résultats positifs.

Une neuro-inflammation a également été mise en évidence dans la DFT. La présence d'astrocytes et de microglies activés a été rapportée dès 1993 dans le cerveau de patients (Brun, Liu, & Erikson, 1995; Mann, South, Snowden, & Neary, 1993). Une étude publiée en 2003 montra de plus que l'activation astrocytaire dans le cortex frontal est corrélée positivement avec le niveau d'atrophie et qu'une activation microgliale dans la substance blanche est présente à des stades précoces de la maladie (Schofield, Kersaitis, Shepherd, Kril, & Halliday, 2003). Une autre étude confirma qu'une activation astrocytaire est présente à des stades précoces de la pathologie, avant la neurodégénérescence massive (Kersaitis, Halliday, & Kril, 2004). Par ailleurs, le niveau de cytokine IL-6 circulante est augmenté chez des patients DFT porteurs de mutations sur la PRGN (Bossù et al., 2011). De façon plus générale, une augmentation des cytokines pro et anti-inflammatoires a été mise en évidence dans le LCR de patients DFT (Sjögren, Folkesson, Blennow, & Tarkowski, 2004). Ces études suggèrent donc un rôle prépondérant de l'activation gliale et de l'inflammation dans la pathologie. Elles ne permettent cependant pas de savoir si cette neuro-inflammation est bénéfique ou délétère pour les neurones.

Parallèlement à cette activation astrocytaire, plusieurs études montrèrent une dégénérescence des astrocytes dans le cerveau de patients DFT (Martin, Craft, Su, Kim, & Cotman, n.d.; Su et al., 2000). Ces études montrent un processus apoptotique avec une surexpression de la caspase-3 et une morphologie caractéristique de dégénérescence dans les astrocytes des patients. L'hypothèse d'un dysfonctionnement astrocytaire dans la DFT a été proposée suite à la découverte de l'importance des mutations sur la PGRN, à cause du rôle anti-inflammatoire et neuro-protecteur de cette protéine (Ahmed et al., 2007).

Le rôle des astrocytes dans la DFT a été étudié chez les modèles animaux. Une neuro-inflammation a été observée dans de nombreux modèles transgéniques de DFT, notamment ceux basés sur l'expression de mutation TDP-43 (Swarup et al., 2011), tau (Yoshiyama et al., 2007), CHMP2B (Ghazi-Noori et al., 2012), ou sur l'extinction de la PGRN (F. Yin, Banerjee, et al., 2010). L'équipe de Yoshiyama montra qu'une activation

microgliale apparait précocement dans la pathologie dans un modèle murin de DFT basé sur l'expression de tau P301S. Ils montrèrent également qu'une immunosuppression dans ce modèle est bénéfique pour la survie des neurones. De plus, une étude publiée en 2005 montra qu'une surexpression conditionnelle de tau dans les astrocytes induit d'une part l'accumulation de tau hyperphosphorylée et ubiquitinée dans ces cellules et d'autre part une neurodégénérescence (Forman et al., 2005). Ces études indiquent donc une participation des astrocytes dans la neurodégénérescence au moins dans les DFT à inclusions tau positives. A l'inverse, une autre étude utilisant un modèle de DFT basé sur l'inhibition de la PGRN montre que les atteintes comportementales de type DFT observées chez ces souris sont indépendante de l'activation astrocytaire et de l'inflammation (Filiano et al., 2013).

D. Les modèles de SLA et de DFT

1. Les modèles existants

Notre compréhension de la SLA et de la DFT a beaucoup évoluée grâce à la découverte des différentes causes génétiques de ces maladies. Des animaux transgéniques exprimant des mutations sur des gènes de la SLA et de la DFT ont été créés et ont permis de grandes avancées dans la recherche des mécanismes sous tendant ces pathologies. Bien que la plupart des modèles transgéniques aient été réalisés chez la souris, la drosophile et le nématode *C. elegans* ont également été utilisés. Deux études chez *C. elegans* reproduisant une tauopathie ont montré des défauts de comportement et des défauts synaptiques générés par l'expression d'une protéine tau mutée (Kraemer et al., 2003; Miyasaka et al., 2005). Chez la drosophile, l'expression neuronale d'une mutation DFT de tau induit une neurodégénérescence progressive (Wittmann et al., 2001). Chez la souris, des modèles ont été créés, basés sur les gènes *SOD1*, *TARDBP*, *GRN*, *VCP*, *MAPT* et *CHMP2B*.

a) *SOD1*

Suite à la découverte en 1993 de mutations SOD-1 responsables de SLA, plus de 15 lignées transgéniques exprimant ces mutations ont été générées. La première lignée fut publiée en 1994 et est basée sur l'expression du gène humain de la SOD1 portant la

mutation G93A (Gurney et al., 1994). Elle demeure à ce jour le modèle de SLA le plus utilisé. Quelle que soit la mutation exprimée, les souris développent des caractéristiques physiopathologiques de la SLA, avec une perte massive des motoneurones de la moelle épinière, l'accumulation d'agrégats protéiques ubiquitinés et une astrocytose. Ces changements sont accompagnés d'une dénervation musculaire associée à une paralysie progressive. L'étude de ces modèles a conduit à de nombreuses hypothèses sur les mécanismes pathologiques responsables de la mort des motoneurones, telles que le stress oxydatif, la toxicité du glutamate, le défaut de transport axonal ou un dysfonctionnement mitochondrial. Des modèles basés sur une expression conditionnelle de la SOD1 mutée ont marqué un tournant dans la recherche sur la SLA. Ainsi, l'expression spécifiquement neuronale de différentes mutations, dont la mutation G93A, ne permet pas d'induire un phénotype de SLA (Lino, Schneider, & Caroni, 2002; Pramatarova, Laganière, Roussel, Brisebois, & Rouleau, 2001) ou ne génère qu'un phénotype très retardé et amoindri par rapport à une expression ubiquitaire du transgène (Jaarsma, Teuling, Haasdijk, De Zeeuw, & Hoogenraad, 2008), prouvant que les motoneurones ne sont pas le seul type cellulaire responsable de la maladie.

b) TDP43

L'importance histopathologique de TDP-43 dans la SLA et la DFT révélée en 2006 (Neumann et al., 2006), puis la découverte à partir de 2008 de mutations causatives de SLA et de DFT ont conduit à la génération de différents modèles basés sur l'expression de mutants de TDP-43 de la SLA et de la DFT chez les souris.

Plusieurs modèles sont basés sur une surexpression de TDP-43 sauvage ou mutée sous le contrôle du promoteur prion (Stallings, Puttaparthi, Luther, Burns, & Elliott, 2010; Wegorzewska, Bell, Cairns, Miller, & Baloh, 2009; Xu et al., 2010, 2011). Ce promoteur conduit à une expression prépondérante dans le système nerveux central, et dans une moindre mesure dans le cœur, les muscles, les poumons et le foie. Ces lignées développent des atteintes motrices associées à une létalité précoce. La sévérité du phénotype semble due au niveau de surexpression de TDP-43 et non à la présence de mutation dans la protéine. En effet, le phénotype est plus sévère lorsque le niveau d'expression est élevé, et la surexpression de la forme humaine sauvage de TDP-43 suffit à induire ce phénotype. Seule une étude a montré une perte de neurones dans la couche

V du cortex moteur (zone où sont situés les neurones moteurs) et une perte de 20% de motoneurones dans la moelle épinière lombaire (Wegorzewska et al., 2009). Par contre, plusieurs lignées présentent des atteintes axonales.

La surexpression neuronale (sous le contrôle des promoteurs Thy1.2 ou CaMKII) de TDP-43 sauvage induit également un phénotype marqué dans plusieurs modèles, avec des atteintes motrices sévères conduisant à la mort en quelques semaines à quelques mois (Shan, Chiang, Price, & Wong, 2010; Tsai et al., 2010; Wils et al., 2010). Ceci est accompagné d'inclusions neuronales nucléaires ou cytoplasmiques positives pour TDP-43 dans la plupart des cas. De façon intéressante, l'expression spécifiquement neuronale de TDP-43 sauvage humaine induit une mort des MN dans une de ces études (Wils et al., 2010).

Enfin, deux études ont rapporté des atteintes comportementales: une surexpression ubiquitaire de TDP-43 humaine sauvage ou mutée conduit à des atteintes motrices et des défauts de mémoire et d'apprentissage dans une étude publiée en 2011 (Swarup et al., 2011). L'expression de TDP-43 sauvage dans les neurones corticaux et hippocampiques induit également des atteintes motrices et des défauts d'apprentissage et de mémoire (Tsai et al., 2010).

Afin d'étudier le rôle physiologique de TDP-43 et l'impact éventuel d'une perte de fonction chez les patients, plusieurs études se sont penchées sur une extinction de l'expression de TDP-43. L'extinction par invalidation génique de l'expression de TDP-43 est létale au niveau embryonnaire. De plus l'extinction conditionnelle de TDP-43 chez l'adulte induit la mort en 9 jours, due à une augmentation de l'oxydation des acides gras et de la perte de poids associée. Ce phénotype extrême n'a pas permis d'étudier le rôle potentiel d'une perte de fonction de TDP-43 dans la neurodégénérescence. Par contre, la perte de fonction de TDP-43 spécifiquement dans les MN de la moelle épinière induit des atteintes motrices, une perte de MN et l'accumulation d'agrégats positifs pour l'ubiquitine dans les MN survivants, montrant un possible rôle d'une perte de fonction de TDP-43 dans la SLA (Wu, Cheng, & Shen, 2012).

Plusieurs modèles chez le rat ont été publiés et ont montré que l'expression d'une forme mutée de TDP-43 de façon ubiquitaire (Zhou et al., 2010) ou limitée aux MN de la

moelle épinière (Huang, Tong, Bi, Zhou, & Xia, 2012) induit des atteintes motrices associées à une perte de MN et à des inclusions cytoplasmiques de TDP-43.

c) FUS

Seules trois études utilisant des modèles murins de FUS ont été publiées à ce jour. La première étude utilise une approche adénovirale permettant une surexpression neuronale de FUS sauvage ou de deux formes mutées. Trois mois après l'injection, les auteurs montrent des inclusions neuronales cytoplasmiques positives pour FUS, ubiquitine et p62 sans pour autant observer de phénotype moteur ni de perte de MN (Verbeeck et al., 2012). Dans la deuxième étude, la surexpression de FUS sauvage humaine sous le contrôle du promoteur prion entraîne un déficit moteur majeur entraînant la mort des animaux à 12 semaines (Mitchell et al., 2013). Les souris présentent une perte importante de motoneurons (environ 60%) associée à la présence d'inclusions cytoplasmiques positives pour FUS et à une astrocytose dans la moelle épinière. La troisième étude est basée sur l'extinction de l'expression de FUS et montre une léthalité périnatale des souris (Hicks et al., 2000).

A ce jour, aucune donnée n'est disponible concernant de possibles atteintes comportementales des souris FUS générées.

d) VCP

Les mutations dans le gène VCP produisent une DFT de type particulier, l'IBMPPD, associée à un phénotype moteur (non SLA), la myopathie à inclusions, et une atteinte osseuse: la maladie des os de Paget. De plus, plusieurs mutations sur VCP ont été découvertes dans des cas de SLA. Plusieurs modèles se sont focalisés sur une expression spécifiquement musculaire de mutations VCP et ne modélisent pas la DFT. Trois lignées de souris expriment une mutation de VCP de façon ubiquitaire et reproduisent des défauts musculaires, osseux et nerveux (Badadani et al., 2010; Custer, Neumann, Lu, Wright, & Taylor, 2010). Au niveau neuronal, ces modèles présentent une accumulation neuronale cytoplasmique de TDP-43 ubiquitiné, ce qui est en accord avec l'histopathologie des patients. Une lignée de souris exprimant une mutation commune à la SLA et à l'IBMPPD développe un phénotype tardif de type SLA, avec une perte des motoneurons, des inclusions positives pour TDP-43, une astrocytose et une dénervation musculaire tardive (H. Z. Yin et al., 2012). Une étude a rapporté des défauts

d'apprentissage et de mémoire ainsi que des inclusions neuronales positives pour TDP-43 et ubiquitine dans une lignée exprimant une mutation VCP (Rodriguez-Ortiz et al., 2013).

e) MAPT

Des mutations sur tau sont une des causes génétiques majeures de DFT. De plus, 45% des cas de DFT sont associés à des inclusions neuronales de tau, ce qui en fait une cible de choix pour la création de modèles de DFT. La première lignée exprimant la mutation DFT de tau la plus fréquente (P301L) fut publiée en 2000 et montre des atteintes motrices et le développement d'enchevêtrements neurofibrillaires (Lewis et al., 2000). Ces souris présentent également une perte neuronale dans la moelle épinière et l'accumulation d'une forme insoluble de tau. Une autre lignée basée sur la même mutation montre également des défauts de mémoire chez les souris. Deux lignées sur-exprimant cette mutation ou la tau humaine sauvage dans les cellules gliales présentent des dysfonctionnements neuronaux et des atteintes axonales (Forman et al., 2005; Higuchi et al., 2005), démontrant l'implication des cellules gliales dans la neurodégénérescence. L'expression d'une autre mutation responsable de DFT (P301S) sous le contrôle du promoteur prion conduit également à une perte neuronale. L'expression neuronale de la mutation $\Delta K280$ conduit à une mort neuronale et à des défauts d'apprentissage et de mémoire. L'étude des modèles transgéniques de tauopathies a montré une dissociation entre les atteintes comportementales et histopathologiques et la formation des enchevêtrements neurofibrillaires. En effet, dans la publication de Yoshiyama, la perte neuronale précède la formation de ces enchevêtrements. De plus, l'extinction conditionnelle de l'expression de tau mutée reverse le phénotype comportemental malgré la persistance des enchevêtrements neurofibrillaires et de la perte neuronale dans deux modèles transgéniques de tauopathies.

a) PGRN

Chez les patients DFT, les mutations sur la PGRN induisent une diminution d'expression de la protéine ou sa perte de fonction. Ainsi, les modèles basés sur la PGRN tendent à reproduire cette déficience de la PGRN. Plusieurs lignées présentant une extinction de la PGRN ont été publiées (Ghoshal, Dearborn, Wozniak, & Cairns, 2012;

Kayasuga et al., 2007; F. Yin, Banerjee, et al., 2010; F. Yin, Dumont, et al., 2010). Les souris présentent des inclusions protéiques neuronales positives pour l'ubiquitine, et dans un cas, positives pour TDP-43 (F. Yin, Banerjee, et al., 2010), ce qui est homologue aux patients. Toutes les lignées publiées montrent une neuro-inflammation, avec une activation astrocytaire et microgliale. Des défauts de comportement ont également été observés, notamment des défauts d'apprentissage et de mémoire spatiale, de la désinhibition et des défauts de comportement social (Filiano et al., 2013; Ghoshal et al., 2012; Petkau et al., 2012; F. Yin, Dumont, et al., 2010). Contrairement aux patients, où une perte partielle de PGRN provoque une DFT, les modèles murins reposent sur une perte complète de la protéine, tandis qu'une perte partielle ne provoque pas de phénotype particulier. Seule une publication a montré qu'une perte partielle de PGRN provoque des atteintes du comportement social en absence de neuro-inflammation (Filiano et al., 2013).

2. Approches méthodologiques utilisées

Les approches utilisées pour caractériser des modèles transgéniques de SLA et de DFT varient en fonction du gène d'intérêt et des symptômes particuliers éventuels développés par les patients porteurs de mutations sur le gène ciblé. Elles dépendent également de l'approche plutôt SLA ou plutôt DFT choisie par les auteurs. Cependant ces caractérisations sont basées sur l'utilisation concomitante d'approches histologiques, qui permettent de caractériser les changements qualitatif et quantitatif au niveau cellulaire et tissulaire, et d'approches comportementales qui évaluent selon les pathologies considérées les changements moteurs, comportementaux et cognitifs.

L'utilisation de l'ensemble de ces approches permet de caractériser précisément le phénotype des souris générées afin de pouvoir le comparer au tableau clinique décrit pour les patients portant le gène muté considéré.

De façon générale, lors de la génération d'une nouvelle lignée de souris transgénique, l'impact de la surexpression ou de l'extinction du gène d'intérêt sur la survie des animaux est étudié. L'approche histopathologique mise en oeuvre consiste ensuite à rechercher des marqueurs caractéristiques de la SLA et de la DFT: des agrégats protéiques ubiquitinés, protéine tau hyperphosphorylée, présence de TDP-43 et FUS dans des agrégats (Blokhuis et al., 2013), présence d'astrocytose dans les tissus plus

spécifiquement touchés dans chaque pathologie. Pour les modèles de SLA, la perte de motoneurons dans la moelle épinière est souvent recherchée alors que celle de neurones du cortex moteur l'est plus rarement tout comme l'étude histologique du muscle et de la JNM (McGoldrick, Joyce, Fisher, & Greensmith, 2013). Pour les modèles de DFT, l'analyse repose bien souvent sur la recherche des marqueurs histopathologiques cités plus haut dans le cortex frontal et l'hippocampe ou dans l'ensemble du cerveau (Roberson, 2012). Certaines études recherchent également des comportements de type démence chez les animaux (Roberson, 2012).

Lorsque le phénotype moteur est étudié, les auteurs utilisent différents tests mesurant la force, la coordination motrice. Un certain nombre de lignées montrent une perte du réflexe d'extension des membres postérieurs lorsqu'elles sont suspendues par la queue. Ce phénomène de rétraction des membres postérieurs est signe d'une atteinte nerveuse et n'est pas spécifique des modèles de SLA. Le test d'agrippement (ou grip test) est utilisé pour mesurer la force musculaire (Canton, Pratt, Stutzmann, Imperato, & Boireau, 1998; Swarup et al., 2011; Weydt, Hong, Kliot, & Möller, 2003). Ce test utilise le réflexe d'agrippement des souris en mesurant la force que déploie une souris pour s'agripper à une grille lorsque l'expérimentateur la tire doucement par l'arrière. Des défauts de coordination motrice chez les souris sont également évalués en utilisant le test du rotarod (Weydt et al., 2003): les souris avancent sur un cylindre en rotation constante ou en accélération et le temps pendant lequel les souris sont capables d'avancer sur le cylindre avant de tomber est mesuré. La capacité des souris à marcher sur une barre étroite permet également d'évaluer la coordination motrice. Des atteintes motrices plus générales peuvent être évaluées grâce à l'analyse des empreintes de pas ou de la capacité des souris à se retourner lorsqu'elles sont placées sur le dos. Souvent, les auteurs réalisent plusieurs de ces tests complémentaires, associés à la mesure du poids des souris pour donner une note globale rendant compte du degré de la pathologie (Knippenberg, Thau, Dengler, & Petri, 2010). De plus la dénervation musculaire peut être évaluée et suivie au cours de la pathologie par électromyographie (EMG) (Peled-Kamar et al., 1997). Ce test est communément utilisé pour le diagnostic des patients (de Carvalho et al., 2008), mais l'est plus rarement chez la souris. Il consiste à mesurer l'activité électrique d'un muscle au repos: les fibres musculaires dénervées ne subissent plus le contrôle électrique du nerf et présentent une activité électrique spontanée, se

manifestant notamment dans le cas de la SLA par des fibrillations, des fasciculations et des décharges myotoniques.

Les phénotypes de type démence sont également recherchés dans certains modèles de DFT. Lorsque les auteurs s'intéressent au comportement des animaux, l'analyse des capacités d'apprentissage et de la mémoire est presque systématiquement réalisée, grâce à des tests de reconnaissance d'objets, de mémoire spatiale (piscine de Morris) ou de peur conditionnée (Ghoshal et al., 2012; Levenga et al., 2013; Rodriguez-Ortiz et al., 2013; Tatebayashi et al., 2002; Tsai et al., 2010; F. Yin, Dumont, et al., 2010). D'autres types de comportements sont plus rarement analysés, tels que le comportement social (intérêt pour la nouveauté sociale, agressivité) (Filiano et al., 2013; Petkau et al., 2012; F. Yin, Dumont, et al., 2010), la désinhibition (Cook et al., 2014; Egashira et al., 2005; F. Yin, Dumont, et al., 2010) et la dépression (Egashira et al., 2005; Petkau et al., 2012; F. Yin, Dumont, et al., 2010).

Les tests de comportement utilisés et leur pertinence par rapport à la DFT sont présentés dans la revue jointe à la thèse (paragraphe I. D. 4 de l'introduction).

3. Avantages et limites des modèles existants

Modéliser une pathologie chez l'animal est une nécessité pour étudier les mécanismes pathologiques mais également pour tester des voies thérapeutiques. Bien qu'un modèle ne puisse pas être identique à l'homme, il est important qu'il se rapproche le plus possible de la maladie ciblée et des critères nous permettent de juger dans quelles limites un modèle est pertinent pour une maladie donnée. Le premier critère est celui de l'identité de cause (ou homologie du modèle). La pathologie doit être générée par une même cause dans le modèle animal et chez l'humain. C'est par exemple le cas avec l'expression chez la souris d'une mutation délétère identifiée chez l'humain. Le deuxième critère est celui de l'identité des symptômes (ou isomorphisme du modèle). L'animal doit reproduire des symptômes les plus proches possibles de ceux développés par l'Homme. Le troisième critère est celui de la prédictibilité du modèle. Il implique qu'un traitement pharmaceutique ayant un effet chez le modèle aura un effet similaire chez l'homme. Très peu de modèles animaux remplissent complètement ces trois critères, notamment chez la souris, en raison des différences physiologiques qui existent

avec l'Homme. Dans le cas de SLA et de DFT, un certain nombre de modèle utilise l'expression d'une mutation causative de SLA ou de DFT chez l'humain.

Les lignées transgéniques basées sur l'expression de mutations de la SOD1 sont à ce jour les modèle de SLA les plus utilisés. Ces souris sont en effet les seules à reproduire la perte massive de motoneurones et la dénervation musculaire observées chez les patients. Cependant, chez les souris SOD1, la protéine mutée est exprimée à un niveau supérieur à la protéine sauvage endogène (de l'ordre de 25 fois dans la lignée G93A), ce qui ne correspond pas à l'humain. Ainsi, il est possible que chez la souris, le phénotype observé ne soit pas du à l'expression de la mutation mais à la surexpression de la protéine. Ceci est appuyé par le fait que l'expression de la SOD1 sauvage à un niveau similaire à la SOD1 mutée de la lignée G93A conduit à un phénotype de type SLA, avec la mort des motoneurones, une astrocytose dans la moelle épinière, des atteintes motrices et une durée de vie réduite (Graffmo et al., 2013). De plus, il a été montré que la sévérité du phénotype dans la lignée G93A dépend du nombre de copies du transgène (Gurney et al., 1994). Une autre faiblesse des modèles SOD1 est la faible représentativité des mutations SOD1 chez les patients SLA, puisque ces mutations sont présentes chez 2% des patients. De plus, les patients porteurs de mutations SOD1 présentent la particularité d'avoir des agrégats protéiques ne contenant pas de TDP-43, contrairement aux autres patients.

Les modèles murins basés sur la surexpression de formes mutées de TDP-43 ou FUS présentent une bonne identité de cause avec la SLA et la DFT car des mutations sont présentes chez les patients. La surexpression des formes sauvages de ces protéines permet quand à elle d'étudier leur rôle dans les inclusions, de façon homologue aux patients qui présentent des inclusions positives pour TDP-43 ou FUS. Dans ces lignées transgéniques, qu'il s'agisse de l'expression d'une forme mutée ou sauvage de la protéine, une faible surexpression du transgène par rapport à la protéine endogène est suffisante pour induire des atteintes histopathologiques dans le SNC et des atteintes motrices sévères. Cependant, aucune de ces lignées ne développe de véritables symptômes de SLA comme ceux observés dans les lignées SOD1. Ainsi, une perte modeste de motoneurones ou de faibles altérations de la jonction neuromusculaire ont été décrite dans une minorité de modèles murins.

Un grand nombre de molécules, ciblant différents mécanismes pathologiques potentiels, ont été testés sur les modèles SOD1 majoritairement. Ces molécules ciblent des mécanismes tels que la fonction mitochondriale, le stress oxydant, la dégradation protéique ou l'inflammation et ont pour la plupart montré des effets positifs chez la souris (McGoldrick et al., 2013). Hélas, aucune de ces molécules n'a montré d'effet bénéfique lors d'essais cliniques chez l'humain. Ceci peut s'expliquer par le fait que les traitements sont réalisés de façon pré-symptomatique chez la souris, ce qui n'a pas une bonne valeur prédictive puisque les patients ne peuvent, dans la majorité des cas, être traités qu'après le diagnostic, à des stades avancés de la maladie. Le manque de prédictibilité des modèles de SLA et de DFT est la principale limitation de ces modèles aujourd'hui.

4. Revue: Behavior evaluation in mouse models of bvFTD

Le variant comportemental de la DFT est une maladie neurodégénérative affectant des individus entre 55 et 65 ans. Elle est caractérisée par des changements du caractère et du comportement social. Ces changements sont causés par une atrophie massive et caractéristique au niveau du cortex frontal et, dans une moindre mesure, du cortex temporal. Pendant longtemps, la description des symptômes de la DFT est restée floue, conduisant à des erreurs de diagnostic et à une sous-évaluation de l'importance de cette maladie. Un premier consensus sur les critères de diagnostics de la DFT a été publié en 1998 et a été mis à jour en 2011. Ces critères prennent en compte la progressivité des troubles, des atteintes des fonctions exécutives, des changements alimentaires et une préservation des fonctions mnésiques.

Des mutations sur neuf gènes différents sont responsables d'environ 30% des cas de DFT. L'identification de ces mutations a permis la génération de lignées transgéniques modélisant la pathologie. Ces modèles reproduisent les marqueurs histopathologiques de la DFT et, pour certains d'entre eux, des atteintes comportementales reflétant les symptômes de la DFT.

L'analyse des effets d'une mutation sur le comportement en plus de l'analyse histologique est indispensable pour comprendre le lien entre la présence d'atteintes au niveau cellulaire et la présence d'atteintes du comportement. De plus, dans le cadre d'études pré-cliniques, il est important de connaître l'effet d'un agent pharmacologique sur le comportement de l'animal.

Cette revue présente les tests qui ont été utilisés pour évaluer les atteintes comportementales dans les modèles murins de DFT et leur pertinence par rapport à la maladie humaine. Les tests les plus fréquemment utilisés sont des tests de mémoire, de comportement social, d'anxiété et de dépression. La revue propose également des tests mesurant d'autres types de comportements correspondants aux symptômes de la DFT, notamment des tests mesurant l'inflexibilité comportementale, l'impulsivité ou le comportement alimentaire.

BEHAVIOR EVALUATION IN MOUSE MODELS OF bvFTD

Vernay Aurelia, Sellal François, Loeffler Jean-Philippe, René Frédérique.

ABSTRACT	2
INTRODUCTION:	3
OVERVIEW OF THE CLINICAL PRESENTATION OF bvFTD	3
IMAGING OF bvFTD	4
GENETIC OF FTD AND FTD MOUSE MODELS	4
THE FTD SYMPTOMS AND CORRESPONDING TESTS IN MICE	5
APATHY OR INERTIA	5
DISINHIBITION	6
LACK OF EMPATHY	7
PERSEVERATIVE, STEREOTYPED OR COMPULSIVE BEHAVIOR	8
DIETARY CHANGES	8
EXECUTIVE FUNCTION DEFICITS	9
MEMORY AND THE DISTINCTION BETWEEN AD AND FTD	10
DISCUSSION	10
BIBLIOGRAPHY	12

Abstract

The behavioral variant of frontotemporal dementia (bvFTD) is a neurodegenerative disease affecting people in their late 50s and characterized by dramatic changes in individual and social behavior. Despite the heterogeneity in the presentation of the clinical symptoms of bvFTD, some characteristic changes can be highlighted. Social disinhibition, changes in food preference, loss of empathy and apathy are commonly described. This is accompanied with a characteristic and dramatic atrophy of the prefrontal cortex and with the accumulation of protein aggregates in the neurons of this area. Several causative mutations in different genes have been discovered, allowing the development of transgenic animal models, especially mouse models. In mice, attention has been focused on the histopathological aspects of the pathology, but now, studies take more and more interest in assessing the behavioral phenotype of FTD models. Finding the right test corresponding to the human symptoms is quite challenging, especially as the frontal cortex is widely less developed in mice than in humans. Even though challenging, the ability to detect relevant prefrontal cortex impairment in mice is crucial for therapeutic approach. In this review, our aim is to present the approaches that have been used to model the behavioral symptoms of FTD and to explore other relevant approaches to assess behavior involving the prefrontal cortex, as well as the deficits associated with FTD.

Introduction:

Frontotemporal dementia (FTD) is the clinical presentation of frontotemporal lobar degeneration (FTLD), a neurodegenerative disease characterized by an atrophy of the frontal and/or temporal lobe of the cortex. It causes pre-senile dementia, as it affects people in their early sixties. FTLD is the second most common cause of early-onset dementia, after Alzheimer's disease (AD), with a prevalence of 15 cases per 100000 in a 45-64 years population in the UK (1). FTLD is very heterogenous and three types are described, based on the clinical symptoms and imaging (2): The behavioral variant of Frontotemporal Dementia (bvFTD) is the most common form of FTLD and is associated with a preferentially frontal atrophy. It is clinically defined by progressive changes in mood and behavior, particularly social behavior, food related behavior and executive functions. bvFTD can be associated with motor symptoms such as parkinsonism or ALS. Progressive Non Fluent Aphasia (PNFA) is defined by a progressive difficulty to speech with grammatical errors and word retrieval difficulties. PNFA patients can also develop behavioral symptoms like bvFTD, but this subtype is preferentially associated with asymmetric left-sided fronto-temporal cortex atrophy. Finally, Semantic Dementia (SD) is impairment in naming and in word comprehension, associated with bilateral anterior temporal cortex atrophy. We will focus in this article on the bvFTD.

Overview of the clinical presentation of bvFTD

The diagnostic of bvFTD is essentially based on the observation of behavioral changes. The publication in 1998 of a consensus on clinical diagnostic criteria was a major development of the field, permitting a standardization of the diagnostic (3). It was based on a gradual progression of the defects, early decline in social interpersonal and personal conduct, emotional blunting and loss of insight. These criteria have been revised in regard to the increased knowledge and understanding of the disease (4). The progressivity of impairments remains the core criteria for FTD. The revised version highlights the occurrence of feeding disorder. Defects in executive function, while episodic memory is relatively spared, are also important criteria and must be assessed with specific standardized tests

Clinical evaluation is crucial but clinicians face the problem of the overlap of symptoms between bvFTD, psychiatric affects and Alzheimer Disease (AD) (5). For this reason, the clinical evaluation has to be completed with imaging markers.

Imaging of bvFTD

A crucial aspect in the diagnosis of FTD is atrophy in the frontal and temporal cortices. Magnetic Resonance Imaging (MRI) is widely used by clinicians to detect atrophy in patients presenting with clinical signs of FTD. The relative atrophy of distinct areas is heterogeneous. In this way, Whitwell and colleagues described four distinct anatomical subtypes: temporal-dominant, temporofrontoparietal, frontotemporal and frontal-dominant (6). More precisely, the anterior cingulate cortex (ACC) is particularly affected. First, an early and consistent atrophy of the ACC was shown on MRI studies (7–9). In addition with the location of grey matter atrophy, abnormalities in frontal white matter tracts were found in the ACC (10), and were predictive of executive function impairments. Moreover, One study showed a hypometabolism and a reduced serotonin receptor density in the ACC (11). The ACC is a part of the salience network (12); indeed, resting state functional MRI studies showed reduced connectivity in the salience network in FTD patients (13–15). These studies showed also connectivity changes in the default mode network, corresponding to either an increased or to a decreased connectivity. The salience network responds to external stimulus to trigger an appropriate behavior, whereas the default mode network is activated when subjects have an internal focus of attention. The salience network and the default mode network are prone to interact, thus the salience network can inhibit the default mode network (16). Subcortical regions of the brain, such as the thalamus, the amygdala and the hippocampus, have also been reported as atrophied (17, 18). Whereas ACC and hippocampus alterations are seen early in the disease, atrophy (8) and hypometabolism (19) will spread out with the progression of the disease and extend to the whole frontal cortex and parts of the parietal and temporal lobes.

Genetic of FTD and FTD mouse models

FTD has a strong genetic contribution as up to 50% of patients have a familial history of FTD. Although all the genetic causes are not known, mutations on several genes have been identified in sporadic as well as familial cases and account for about 30% of FTD cases (20). The most frequent gene mutations are found in *C9ORF72*, *MAPT* (Microtubule Associated Protein Tau) and *PGRN* (progranulin), but mutations in the genes *TARDBP*, *VCP* or *CHMP2B* and other genes have also been found. Mouse transgenic lines expressing human mutations on the genes *CHMP2B*, *TARDBP*, *VCP* or based on a *PGRN* deficiency have been generated so far and have been reviewed by Roberson (21). They reproduce the main histopathological features of FTD, namely the characteristic neuronal protein inclusions containing tau, TDP-43 or ubiquitin. Although publications used to focus on the histopathological characterization of the transgenic

models, more studies now pay attention on the behavioral characterization of the mice. Table 1 summarizes the behavioral assessment performed so far in the transgenic mouse FTD models. As the table 1 points out, the different studies used a wide range of behavioral tasks, focusing on different aspects of the human disease. This highlights that, despite an increasing interest for behavioral assessment, there is no consensus on the best tasks to perform to characterize an FTD model. In this review, our goal is to connect the human behaviors that are impaired in FTD with homological behaviors in mice and to present possible tests to assess these behaviors.

The FTD symptoms and corresponding tests in mice

We will describe the six behavioral aspects of the revised diagnostic criteria for bvFTD and present the known specific brain areas or networks involved in these functions (summarized in table 2). We will also present corresponding tests used or that could be used in FTD mouse models.

Apathy or inertia

In FTD, one of the presenting symptoms is often apathy, defined as a loss of motivation, drive or interest that may mimic a depressive behavior. Patients lose motivation for hobbies and social activities. They become careless of their relatives. More generally, patients lose interest for anything. This can evolve toward complete failure to initiate any activity in everyday life, such as teeth brushing or conversations. Apathy is correlated with an important atrophy of the right dorso-lateral prefrontal cortex (22).

Different tests have been used to study apathy in FTD mice. Yin et al used the tail suspension test and the forced swimming test in an FTD mouse model based on a PGRN deficiency. They showed decreased struggle of FTD mice in these tests, indicating a depressive-like behavior. In the tail suspension test, the mouse is hold by the tail for 3 minutes. The mouse will naturally try to escape from this stressful situation by moving the limbs, but after a while, it will stop to move. The time spent unmoving is considered as indicative of the depressive status of the mouse. The swimming test is based on the same principle but the mouse has to swim in a water bath. These tests are extensively used in mouse models of depression, but may not be relevant for FTD, first because they are indicatives of chronic stress induced depression, which is not the case in FTD (23). Second, because they do not reflect a lack of motivation for something but rather a resignation to a stressful situation (24). The drive for building a nest in the nest test is rather a test of motivation. It could be used in bvFTD mouse models.

Disinhibition

Patients can present with disinhibition and Restlessness. Disinhibition can be defined as acting with impulsivity and without caring of the consequences, i.e., stealing objects or food. Impulsivity can be evaluated with Go/No Go tests. Disinhibition also leads to breaking of social norms or convention, such as inappropriate touching or sexual acts, uttering offensive remarks. Public nudity or urination can be present in the late stage of the disease.

Disinhibition is correlated with a massive atrophy of the right parts of the nucleus accumbens, superior temporal sulcus and mediotemporal limbic structures (22).

Disinhibition in the mouse is generally assessed using anxiety related tasks. The elevated plus maze test and the light/dark box test are based on the balance between curiosity and fear. Mice have a natural inclination to explore a new environment but this curiosity is inhibited by natural fear of open and bright environment. These tests have been widely used for anxiety models and are predictive of anxiolytic or anxiogenic effects of drugs. The anxiety related behavior assessed by these tests are dependent of the amygdala, a structure affected in bvFTD (25). The elevated plus maze has been used in a PGRN deficiency based transgenic model of bvFTD, in which mice spent more time in the open arms, showing a disinhibited behavior (26). The light/dark box test showed opposite results in two studies based on mice expressing two different tau mutation (P301L and R406W): one line showed a disinhibited behavior (27) and the other showed no defect (28). In line with the emotion blunting and fear conditioning deficit in FTD (29), a PGRN deficient FTD mouse model (30) and two tau mutation based mouse models (31) showed decreased fear conditioning in an amygdala-dependent cued fear conditioning test. The five-choices serial reaction time task is based on the capacity of a mouse to wait for a delay between the stimulus and the response to get the reinforcer and is a test of impulsivity dependent of the prefrontal cortex (32). This test has been used in a transgenic tau mutation based model of FTD, showing increased impulsivity, exacerbated with age in the FTD mice (33). Some other test used to evaluate alcohol relative impulsivity could be also relevant for bvFTD relative impulsivity. A Go/No Go task, developed in mice by Gubner et al. is close to the one used in clinical practice and could be a good tool (34). It consists in assessing the capacity of a mouse to restrain a conditioned behavior. Two different stimuli are randomly delivered: one is enjoining the mouse to respond (nose poke) to get a reward (reinforcer). Conversely, the other stimulus demands inaction of the mouse to deliver the reinforcer. Impulsivity is rated by the amount of responses after the second stimulus, when the mouse should remain inactive (false alarms). These presented tests can model the impulsive aspect of disinhibition, however, they are not relevant for the social aspects of disinhibition in bvFTD.

Lack of empathy

Loss of empathy means the inability of reading emotional expression of others and the inability to predict the thought or reaction of someone else. This is evaluated in patients by assessing the recognition of facial expression of emotions on pictures (35, 36). Negative expressions such as disgust or anger are prone to be more impaired (37). The recognition of facial emotion is dependent of the amygdala (38, 39), thus, such impairments have been associated in bvFTD with the atrophy of the amygdala and the lateral orbitofrontal cortex, particularly on the right side (40). The theory of mind, which is the ability to construct a theory about the mental state of others, is particularly impaired in bvFTD (41, 42) and implicates the tempoparietal network. The theory of mind is evaluated with false-belief tests (43). The false-belief test is made up of short comic strips illustrating scenarios. The aim is to understand the story, then to answer a question about one character's belief.

Social disinterest is observed and interpreted as a consequence of loss of empathy in FTD patients and can be modeled in mice. The three chamber sociability test has been widely used in autism models and also in FTD models (26, 30). In this paradigm, the tested mouse is placed in the central chamber of a three chamber apparatus and allowed to explore the other rooms either containing an unknown mouse or empty. The time spent to interact with the unknown mouse indicate the social interest of the tested mouse. Two different PGRN deficient mouse FTD models showed impaired social interest in this paradigm (26, 30). Measurement of social interactions with an unknown mouse in the home cage (the resident intruder paradigm) showed also decreased social interest in two bvFTD models (44, 45). Loss of empathy seems challenging to model in mice, because the prefrontal cortex is drastically less developed in mice than in humans, and because the existence of the theory of mind has been proven only in apes. It has been proven, however, that mice can detect pain and fear in their fellow, which influences their own feeling and behavior. Detection and response to fear from another mouse has been measured with the observational fear conditioning test in 2010 by Jeon et al. (46). Briefly, two mice are placed in each chamber of a double-chamber fear-conditioning system and separated by a transparent partition. The observer mouse can see the demonstrator mouse receiving mild electrical foot-shocks. The typical response of the observer is a freezing behavior showing fear induced by observation of a conspecific in pain. Interestingly, this observational fear learning is enhanced when the demonstrator is a cagemate, showing that this behavior is dependent of social connection. Moreover, this observational fear learning is dependent of the ACC and the amygdala, two structures involved in the recognition of fear in humans (47, 48) and particularly defectives in FTD (17, 29). This paradigm is used in autism modeling but could also be of high

relevance for FTD, given the proximity of the behavior and the correspondence of involved brain structures.

Perseverative, stereotyped or compulsive behavior

bvFTD patients can show different types of stereotypies, from simple repetition of movement to compulsive collection of objects (49, 50). One aspect can be the need of handling, displacing or ordering presented object without any purpose. For instance a patient can not prevent himself from preparing a drink when a glass, a piece of sugar and warmed water are presented, even if he was told to do not move and if he is not thirsty.

Mice can spontaneously develop some stereotypic behavior, but this phenomenon is increased with a chronic stress exposure and mouse models of autism are also prone to develop stereotypies. Stereotypy in the mouse manifests by increased grooming, increased digging in the bedding of the cage, somersaults or climbing on the cage walls.

Dietary changes

Changes in alimentary preference are a hallmark of FTD (51). Several different symptoms can occur: overeating, as if patients never reach satiety, binge eating or a too great selectivity for one meal. A preference for sweet food is commonly described in bvFTD patients, thought not very specific, as the tendency occurs in AD and more generally in elderly. bvFTD patients develop a compulsive way of eating associated with a disconnection between feeding and hunger. This overeating behavior seems to be associated with a higher degree of atrophy in the right orbitofrontal cortex, ventral insula and striatum (52). Despite the recognized role of the hypothalamus in eating behavior, only one study investigated the possible role of the hypothalamus in FTD and showed an atrophy of the posterior hypothalamus of FTD patients (53). Interestingly, Wooley et al. recently published a study showing an association between overeating and an anorexigenic hormonal profile (54), which is consistent with the satiety acknowledged by patients and can be interpreted as a compensatory mechanism. At late stages of the disease, these changes can evolve toward hyperorality. Increased alcohol consumption is also very frequent. Patients show compulsive drinking and drinking despite acknowledging no pleasure.

Dietary changes have not been investigated in mouse models of bvFTD, possibly because the recognition of this symptom in bvFTD is recent. Dietary changes and increased alcohol consumption can be modeled in mice with sucrose or alcohol preference tests. As in humans, sucrose preference and consumption is controlled by the hypothalamus. Binge alcohol drinking can be modeled using the Drinking in the Dark test, by measuring the quantity of alcohol

consumed by mice during 2-4 hours into the dark phase of the light-dark cycle, as developed by Rhodes et al. (55). In this paradigm, mice consume high level of alcohol without being alcohol dependent, which is relevant for FTD patient, who are not alcohol dependent. On the other hand, a free choice based test of alcohol seeking showed the importance of the anterior cingulate cortex in alcohol seeking in mice (56). As the anterior cingulate cortex is highly affected in FTD this test could also be of high interest.

Executive function deficits

Executive function includes complex cognitive processes such as abstraction, planning, concentration or mental flexibility. One aspect of executive deficit in FTD patients is the loss of mental flexibility, as shown by the inability to integrate new rules. Mental inflexibility is assessed in patients using specific tests, such as the Wisconsin Card Sorting test (WCST) (57–59). The test consists in ordering cards following one criterion; then, the criterion changes and the patient must adapt to order the cards following the new criterion. The Trail making test is also commonly used for the diagnosis of FTD (60, 61). It consists in ordering one succession of number and one succession of letters and alternating numbers and letters.

Mental flexibility is assessed in models of autism with tests of reversal learning (62, 63). These tests evaluate the capacity of a mouse to adapt to changes in the rules of a previously learned protocol (64). A paradigm equivalent to the WSCT has been adapted to mice and permitted the evaluation of the prefrontal cortex function in mice (65). These tests allow to finely decipher the brain areas and neurotransmitters involved in reversal and attentional set-shifting abilities, as reviewed by Bissonette and Powell (66), and could be of high interest in bvFTD modeling.

Lack of concentration is common in bvFTD and is associated with working memory deficits (67). For instance, bvFTD patients show deficits in the Stroop test (57). This test measures selective attention or the ability of inhibition. The principle is to assess the interference effect of non-relevant information during the execution of a cognitive task. In practice, the patient is asked to tell the color of a batch of words, but the words are the name of colors; so the patient has to concentrate on the color of the word, while disregarding the meaning of this word.

An original and elegant modeling of attention defects, using an adapted version of the Stroop test (68) in a Tau mutation based mouse model of bvFTD was published in 2013 (69). The test consists in learning that two different stimulus in two different contexts demand two different responses. When, in one given context, the two different stimuli are activated in the same time,

the mouse has to choose the relevant stimulus corresponding to the present context in order to give the correct response and get a reinforcer.

Memory: the distinction between AD and FTD

The relative sparing of memory in bvFTD patients is one criterion of the diagnostic and is an important point to discriminate bvFTD from AD. The distinction between AD and FTD is challenging, specifically in early stages of the pathologies. The age of onset is a first hint, as FTD occurs earlier than AD. Clinically, FTD and AD can be hard to distinguish as changes in social behavior, the main effect of FTD, can also occur in AD. However, the presence of severe memory loss is often an exclusive criterion for FTD. Despite the slight symptoms of memory defect in FTD in regard with AD, FTD patients show an atrophy of the hippocampus. Different studies showed contradictory results in regard to the hippocampus, with a range of severe atrophy, to mild or minor atrophy, but taken as a whole, the analysis of hippocampal volumes fails to differentiate AD from FTD (70–72). It appeared however, that the pattern of atrophy within the hippocampus can be specifically localized in the anterior hippocampus (73, 74) in FTD.

Memory has been tested in mouse FTD models giving different results. Spatial memory defects were detected using the Morris Water Maze and the Barnes maze in two PGRN deficient mouse lines (26, 44), one TDP-43 overexpression line (75) and one mutant Tau line (76), but two other PGRN deficient mouse lines did not show spatial memory deficit (30, 45). Different results were also obtained in a novel object recognition test in a TDP-43 overexpression mouse model and a PGRN deficient mouse model (45, 75). The first showing impaired memory in this paradigm, and the latter showing no defect. Interestingly, three different transgenic mouse lines expressing mutant tau showed deficits in the contextual fear conditioning test (27, 31, 77). A mouse model of FTD based on the expression of an FTD related VCP mutation showed impaired learning and memory in the Morris Water Maze, the Novel object recognition test and the contextual fear conditioning test (78). In mice, memory tests have been extensively developed to model AD related memory defects, and the brain structures involved in the different tasks are now finely known (79).

Discussion

The admitted three criteria for the validity of an animal model are the construct validity (identity of the causes), the face validity (homology of the phenotype) and the predictive validity (predictivity of the effects of drugs). FTD mouse models are all based on the expression of a

human causing mutation or on the knocking down of a gene implicated in FTD, so they reach the first criterion of a common cause of the phenotype between mice and patients. The models also show protein inclusions in the neurons of the mice, replicating the histopathological profile of FTD. Behavioral validity is however not always assessed in FTD mouse models, and there is no consensual tests recognized to validate an FTD-like behavior in mice. Social behavior dysfunctions seem nevertheless to be a reliable characteristic of FTD mouse models, as it has been observed in all transgenic lines, when looked for. Based on anatomical and behavioral similarities between mice and humans, we proposed alternative tests that could be relevant to model bvFTD. We proposed a Go/No Go task to model disinhibition (34), an observational fear conditioning test to measure lack of empathy (46), sucrose or alcohol preference tests to measure changes in feeding and reversal learning or the adaptation of the WSCT to assess mental flexibility.

The choice of a specific test has to be done in regard with the symptom of interest and should be guided by the analogy of the behavior and the analogy of the brain structure involved in the test, if known. The physical capacity of the mice to perform the test has to be carefully estimated, as behavioral tests require several senses and motor capacities. For instance the olfactory integrity of the mice is crucial in social tests or tests requiring odor recognition; the visual capacities are also crucial for tests such as the observational fear learning or some spatial memory tests (46, 80). As some FTD mice also develop motor defects, the involvement of motor function in tests has to be considered.

Currently, no treatment for FTD exists, so the management of the patients remains in attenuating the symptoms. Moreover, the impact of protein inclusions in the pathological process of FTD is still not understood. As a result, the predictivity of a drug on an animal model would be difficult to assess with a histopathological point of view as a unique read-out and should rather focus on both the protein aggregates and the behavior. Memantine, an inhibitor of NMDA receptor which has shown beneficial effect on behavior in AD (81) and in an open-label trial in FDT patients (82) is commonly prescribed to FTD patients. However, two placebo-control trials showed no beneficial effect on behavior and rather cognitive adverse side effects in bvFTD patients (83–85). The only treatment with recognized beneficial effects is trazodone, a serotonin recapture inhibitor, which improves feeding behavior and disinhibition in bvFTD patients (86). In mice, trazodone has a protective effect in a sleep-deprivation induced anxiety-like behavior (87), so it would be of interest to assess its effect on the behavior of FTD mouse lines.

Bibliography

1. Ratnavalli E, Brayne C, Dawson K, Hodges JR (2002) The prevalence of frontotemporal dementia. *Neurology* 58:1615–21. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12058088>
2. Rohrer JD, Rosen HJ (2013) Neuroimaging in frontotemporal dementia. *Int Rev Psychiatry* 25:221–9. Available at: <http://informahealthcare.com.gate2.inist.fr/doi/full/10.3109/09540261.2013.778822>
3. Neary D et al. (1998) Frontotemporal lobar degeneration: a consensus on clinical diagnostic criteria. *Neurology* 51:1546–54. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9855500>
4. Rascovsky K et al. (2011) Sensitivity of revised diagnostic criteria for the behavioural variant of frontotemporal dementia. *Brain* 134:2456–77. Available at: [/pmc/articles/PMC3170532/?report=abstract](http://pmc/articles/PMC3170532/?report=abstract)
5. Pose M et al. (2013) The overlap of symptomatic dimensions between frontotemporal dementia and several psychiatric disorders that appear in late adulthood. *Int Rev Psychiatry* 25:159–67. Available at: <http://informahealthcare.com.gate2.inist.fr/doi/full/10.3109/09540261.2013.769939>
6. Whitwell JL et al. (2009) Distinct anatomical subtypes of the behavioural variant of frontotemporal dementia: a cluster analysis study. *Brain* 132:2932–46. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2768663&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
7. Brun A, Gustafson L (1978) Limbic lobe involvement in presenile dementia. *Arch Psychiatr Nervenkr* 226:79–93. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/367312>
8. Broe M et al. (2003) Staging disease severity in pathologically confirmed cases of frontotemporal dementia. *Neurology* 60:1005–11. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12654969>
9. Rosen HJ et al. (2002) Patterns of brain atrophy in frontotemporal dementia and semantic dementia. *Neurology* 58:198–208. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11805245>
10. Tartaglia MC et al. (2012) Executive dysfunction in frontotemporal dementia is related to abnormalities in frontal white matter tracts. *J Neurol* 259:1071–80. Available at: [/pmc/articles/PMC3590313/?report=abstract](http://pmc/articles/PMC3590313/?report=abstract)
11. Franceschi M et al. (2005) Glucose metabolism and serotonin receptors in the frontotemporal lobe degeneration. *Ann Neurol* 57:216–25. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15668960>
12. Seeley WW et al. (2007) Dissociable intrinsic connectivity networks for salience processing and executive control. *J Neurosci* 27:2349–56. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2680293&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
13. Zhou J et al. (2010) Divergent network connectivity changes in behavioural variant frontotemporal dementia and Alzheimer's disease. *Brain* 133:1352–67. Available at: [/pmc/articles/PMC2912696/?report=abstract](http://pmc/articles/PMC2912696/?report=abstract).
14. Farb NAS et al. (2013) Abnormal network connectivity in frontotemporal dementia: evidence for prefrontal isolation. *Cortex* 49:1856–73. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0010945212002936>.
15. Filippi M et al. (2013) Functional network connectivity in the behavioral variant of frontotemporal dementia. *Cortex* 49:2389–401. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23164495>.
16. Jilka SR et al. (2014) Damage to the Salience Network and Interactions with the Default Mode Network. *J Neurosci* 34:10798–10807. Available at: <http://www.jneurosci.org/content/34/33/10798.full>.

17. Schroeter ML, Raczka K, Neumann J, Yves von Cramon D (2007) Towards a nosology for frontotemporal lobar degenerations-a meta-analysis involving 267 subjects. *Neuroimage* 36:497–510. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1053811907002194>.
18. Boccardi M et al. (2005) Frontotemporal dementia as a neural system disease. *Neurobiol Aging* 26:37–44. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15585344>.
19. Diehl-Schmid J et al. (2007) Decline of cerebral glucose metabolism in frontotemporal dementia: a longitudinal 18F-FDG-PET-study. *Neurobiol Aging* 28:42–50. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0197458005003696> [Accessed June 23, 2014].
20. Ling S-C, Polymenidou M, Cleveland DW (2013) Converging mechanisms in ALS and FTD: disrupted RNA and protein homeostasis. *Neuron* 79:416–38. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0896627313006570> [Accessed February 19, 2014].
21. Roberson ED (2012) Mouse models of frontotemporal dementia. *Ann Neurol* 72:837–49. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23280835> [Accessed May 24, 2013].
22. Zamboni G, Huey ED, Krueger F, Nichelli PF, Grafman J (2008) Apathy and disinhibition in frontotemporal dementia: Insights into their neural correlates. *Neurology* 71:736–42. Available at: </pmc/articles/PMC2676948/?report=abstract> [Accessed July 7, 2014].
23. Abelaira HM, Réus GZ, Quevedo J (2013) Animal models as tools to study the pathophysiology of depression. *Rev Bras Psiquiatr* 35 Suppl 2:S112–20. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24271223> [Accessed August 22, 2014].
24. Belzung C (2014) Innovative drugs to treat depression: did animal models fail to be predictive or did clinical trials fail to detect effects? *Neuropsychopharmacology* 39:1041–51. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24345817> [Accessed October 21, 2014].
25. Masneuf S et al. (2014) Glutamatergic mechanisms associated with stress-induced amygdala excitability and anxiety-related behavior. *Neuropharmacology* 85:190–7. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0028390814001518> [Accessed August 25, 2014].
26. Yin F et al. (2010) Behavioral deficits and progressive neuropathology in progranulin-deficient mice: a mouse model of frontotemporal dementia. *FASEB J* 24:4639–47. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2992364&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed August 27, 2012].
27. Cook C et al. (2014) Severe amygdala dysfunction in a MAPT transgenic mouse model of frontotemporal dementia. *Neurobiol Aging* 35:1769–77. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24503275> [Accessed October 13, 2014].
28. Egashira N et al. (2005) Altered depression-related behavior and neurochemical changes in serotonergic neurons in mutant R406W human tau transgenic mice. *Brain Res* 1059:7–12. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16182262> [Accessed October 13, 2014].
29. Hofer M et al. (2008) Fear conditioning in frontotemporal lobar degeneration and Alzheimer's disease. *Brain* 131:1646–57. Available at: </pmc/articles/PMC2544622/?report=abstract> [Accessed August 27, 2014].
30. Filiano AJ et al. (2013) Dissociation of frontotemporal dementia-related deficits and neuroinflammation in progranulin haploinsufficient mice. *J Neurosci* 33:5352–61. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3740510&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed March 26, 2014].
31. Tatebayashi Y et al. (2002) Tau filament formation and associative memory deficit in aged mice expressing mutant (R406W) human tau. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:13896–901. Available at:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=129794&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed October 13, 2014].

32. Robbins TW (2002) The 5-choice serial reaction time task: behavioural pharmacology and functional neurochemistry. *Psychopharmacology (Berl)* 163:362–80. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12373437> [Accessed July 13, 2014].
33. Lambourne SL et al. (2007) Impairments in impulse control in mice transgenic for the human FTDP-17 tauV337M mutation are exacerbated by age. *Hum Mol Genet* 16:1708–19. Available at: <http://hmg.oxfordjournals.org/content/16/14/1708.full> [Accessed March 19, 2014].
34. Gubner NR, Wilhelm CJ, Phillips TJ, Mitchell SH (2010) Strain differences in behavioral inhibition in a Go/No-go task demonstrated using 15 inbred mouse strains. *Alcohol Clin Exp Res* 34:1353–62. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3336215&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed July 9, 2014].
35. Keane J, Calder AJ, Hodges JR, Young AW (2002) Face and emotion processing in frontal variant frontotemporal dementia. *Neuropsychologia* 40:655–665. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0028393201001567> [Accessed August 27, 2014].
36. Werner KH et al. (2007) Emotional reactivity and emotion recognition in frontotemporal lobar degeneration. *Neurology* 69:148–55. Available at: [/pmc/articles/PMC2562666/?report=abstract](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2562666/?report=abstract) [Accessed August 24, 2014].
37. Rosen HJ et al. (2004) Recognition of emotion in the frontal and temporal variants of frontotemporal dementia. *Dement Geriatr Cogn Disord* 17:277–81. Available at: <http://www.karger.com/Article/FullText/77154> [Accessed August 27, 2014].
38. Adolphs R, Tranel D, Damasio H, Damasio A (1994) Impaired recognition of emotion in facial expressions following bilateral damage to the human amygdala. *Nature* 372:669–672.
39. Haxby J, Hoffman E, Gobbini M (2000) The distributed human neural system for face perception. *Trends Cogn Sci* 4:223–233. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10827445> [Accessed August 27, 2014].
40. Kipps CM, Nestor PJ, Acosta-Cabronero J, Arnold R, Hodges JR (2009) Understanding social dysfunction in the behavioural variant of frontotemporal dementia: the role of emotion and sarcasm processing. *Brain* 132:592–603. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19126572> [Accessed July 15, 2014].
41. Couto B et al. (2013) Structural neuroimaging of social cognition in progressive non-fluent aphasia and behavioral variant of frontotemporal dementia. *Front Hum Neurosci* 7:467. Available at: [/pmc/articles/PMC3744869/?report=abstract](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3744869/?report=abstract) [Accessed May 1, 2014].
42. Le Bouc R et al. (2012) My belief or yours? Differential theory of mind deficits in frontotemporal dementia and Alzheimer’s disease. *Brain* 135:3026–38. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23065791> [Accessed July 16, 2014].
43. Duval C et al. (2012) Theory of mind impairments in patients with semantic dementia. *Brain* 135:228–41. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3655376&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed August 4, 2014].
44. Ghoshal N, Dearborn JT, Wozniak DF, Cairns NJ (2012) Core features of frontotemporal dementia recapitulated in progranulin knockout mice. *Neurobiol Dis* 45:395–408. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0969996111002956> [Accessed March 13, 2014].

45. Petkau TL et al. (2012) Synaptic dysfunction in progranulin-deficient mice. *Neurobiol Dis* 45:711–22. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0969996111003482> [Accessed August 27, 2014].
46. Jeon D et al. (2010) Observational fear learning involves affective pain system and Cav1.2 Ca²⁺ channels in ACC. *Nat Neurosci* 13:482–8. Available at: <http://www.nature.com.gate2.inist.fr/neuro/journal/v13/n4/full/nn.2504.html> [Accessed May 15, 2014].
47. Pissioti A et al. (2003) Amygdala and anterior cingulate cortex activation during affective startle modulation: a PET study of fear. *Eur J Neurosci* 18:1325–31. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12956731> [Accessed October 12, 2014].
48. Cremers HR et al. (2010) Neuroticism modulates amygdala-prefrontal connectivity in response to negative emotional facial expressions. *Neuroimage* 49:963–70. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19683585> [Accessed September 16, 2014].
49. Nyatsanza S et al. (2003) A study of stereotypic behaviours in Alzheimer’s disease and frontal and temporal variant frontotemporal dementia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 74:1398–402. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1757381&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed January 21, 2014].
50. Prioni S et al. (2012) Stereotypic behaviors in degenerative dementias. *J Neurol* 259:2452–9. Available at: <http://link.springer.com.gate2.inist.fr/article/10.1007/s00415-012-6528-0/fulltext.html> [Accessed July 15, 2014].
51. Piguet O (2011) Eating disturbance in behavioural-variant frontotemporal dementia. *J Mol Neurosci* 45:589–93. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21584651> [Accessed April 23, 2014].
52. Woolley JD et al. (2007) Binge eating is associated with right orbitofrontal-insular-striatal atrophy in frontotemporal dementia. *Neurology* 69:1424–33. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17909155> [Accessed July 15, 2014].
53. Piguet O et al. (2011) Eating and hypothalamus changes in behavioral-variant frontotemporal dementia. *Ann Neurol* 69:312–9. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3084499&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed April 24, 2014].
54. Woolley JD et al. (2014) Satiety-related hormonal dysregulation in behavioral variant frontotemporal dementia. *Neurology* 82:512–20. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24415571> [Accessed July 8, 2014].
55. Rhodes JS, Best K, Belknap JK, Finn DA, Crabbe JC (2005) Evaluation of a simple model of ethanol drinking to intoxication in C57BL/6J mice. *Physiol Behav* 84:53–63. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031938404004585> [Accessed July 17, 2014].
56. Gremel CM, Young EA, Cunningham CL (2011) Blockade of opioid receptors in anterior cingulate cortex disrupts ethanol-seeking behavior in mice. *Behav Brain Res* 219:358–62. Available at: [/pmc/articles/PMC3062680/?report=abstract](http://pmc/articles/PMC3062680/?report=abstract) [Accessed July 9, 2014].
57. Johns EK et al. (2009) Executive functions in frontotemporal dementia and Lewy body dementia. *Neuropsychology* 23:765–77. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19899835> [Accessed July 21, 2014].
58. Bozeat S (2000) Which neuropsychiatric and behavioural features distinguish frontal and temporal variants of frontotemporal dementia from Alzheimer’s disease? *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 69:178–186. Available at: [/pmc/articles/PMC1737062/?report=abstract](http://pmc/articles/PMC1737062/?report=abstract) [Accessed June 22, 2014].

59. Dubois B, Slachevsky A, Litvan I, Pillon B (2000) The FAB: a Frontal Assessment Battery at bedside. *Neurology* 55:1621–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11113214> [Accessed October 13, 2014].
60. Heidler-Gary J et al. (2007) Utility of behavioral versus cognitive measures in differentiating between subtypes of frontotemporal lobar degeneration and Alzheimer’s disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* 23:184–93. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17220629> [Accessed October 13, 2014].
61. Harciarek M, Jodzio K (2005) Neuropsychological differences between frontotemporal dementia and Alzheimer’s disease: a review. *Neuropsychol Rev* 15:131–45. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16328732> [Accessed October 13, 2014].
62. Moy SS et al. (2007) Mouse behavioral tasks relevant to autism: phenotypes of 10 inbred strains. *Behav Brain Res* 176:4–20. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1857288&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed September 23, 2014].
63. Jiang-Xie L-F et al. (2014) Autism-associated gene Dlgap2 mutant mice demonstrate exacerbated aggressive behaviors and orbitofrontal cortex deficits. *Mol Autism* 5:32. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4113140&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed September 13, 2014].
64. Crawley JN (2007) Mouse behavioral assays relevant to the symptoms of autism. *Brain Pathol* 17:448–59. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17919130> [Accessed August 31, 2014].
65. Colacicco G, Welzl H, Lipp H-P, Würbel H (2002) Attentional set-shifting in mice: modification of a rat paradigm, and evidence for strain-dependent variation. *Behav Brain Res* 132:95–102. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166432801003916> [Accessed July 17, 2014].
66. Bissonette GB, Powell EM (2012) Reversal learning and attentional set-shifting in mice. *Neuropharmacology* 62:1168–74. Available at: [/pmc/articles/PMC3130808/?report=abstract](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3130808/?report=abstract) [Accessed July 15, 2014].
67. Possin KL et al. (2013) Dissociable executive functions in behavioral variant frontotemporal and Alzheimer dementias. *Neurology* 80:2180–5. Available at: [/pmc/articles/PMC3721104/?report=abstract](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3721104/?report=abstract) [Accessed July 11, 2014].
68. Haddon JE, Killcross S (2006) Prefrontal cortex lesions disrupt the contextual control of response conflict. *J Neurosci* 26:2933–40. Available at: <http://www.jneurosci.org/content/26/11/2933.full> [Accessed October 8, 2014].
69. Reichelt AC, Killcross S, Wilkinson LS, Humby T, Good MA (2013) Transgenic expression of the FTDP-17 tauV337M mutation in brain dissociates components of executive function in mice. *Neurobiol Learn Mem* 104:73–81. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1074742713000865> [Accessed July 10, 2014].
70. De Souza LC et al. (2013) Is hippocampal volume a good marker to differentiate Alzheimer’s disease from frontotemporal dementia? *J Alzheimers Dis* 36:57–66. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23542864> [Accessed January 29, 2014].
71. Muñoz-Ruiz MÁ et al. (2012) Structural MRI in frontotemporal dementia: comparisons between hippocampal volumetry, tensor-based morphometry and voxel-based morphometry. *PLoS One* 7:e52531. Available at: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0052531> [Accessed May 30, 2014].
72. Barnes J et al. (2006) Measurements of the amygdala and hippocampus in pathologically confirmed Alzheimer disease and frontotemporal lobar degeneration. *Arch Neurol* 63:1434–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17030660> [Accessed March 12, 2014].

73. Laakso MP et al. (2000) Hippocampus and entorhinal cortex in frontotemporal dementia and Alzheimer's disease: a morphometric MRI study. *Biol Psychiatry* 47:1056–1063. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006322399003066> [Accessed January 25, 2014].
74. Lindberg O et al. (2012) Hippocampal shape analysis in Alzheimer's disease and frontotemporal lobar degeneration subtypes. *J Alzheimers Dis* 30:355–65. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22414571> [Accessed March 12, 2014].
75. Tsai K-J et al. (2010) Elevated expression of TDP-43 in the forebrain of mice is sufficient to cause neurological and pathological phenotypes mimicking FTL-D. *J Exp Med* 207:1661–73. Available at: <http://jem.rupress.org/content/207/8/1661.long> [Accessed July 3, 2014].
76. Swarup V et al. (2011) Pathological hallmarks of amyotrophic lateral sclerosis/frontotemporal lobar degeneration in transgenic mice produced with TDP-43 genomic fragments. *Brain* 134:2610–26. Available at: <http://brain.oxfordjournals.org/content/134/9/2610.full> [Accessed May 1, 2014].
77. Levenson J et al. (2013) Tau pathology induces loss of GABAergic interneurons leading to altered synaptic plasticity and behavioral impairments. *Acta Neuropathol Commun* 1:34. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3893396&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
78. Rodriguez-Ortiz CJ et al. (2013) Neuronal-specific overexpression of a mutant valosin-containing protein associated with IBMPFD promotes aberrant ubiquitin and TDP-43 accumulation and cognitive dysfunction in transgenic mice. *Am J Pathol* 183:504–15. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3730785&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
79. Götz J et al. (2004) Transgenic animal models of Alzheimer's disease and related disorders: histopathology, behavior and therapy. *Mol Psychiatry* 9:664–83. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15052274>
80. Yassine N et al. (2013) Detecting spatial memory deficits beyond blindness in tg2576 Alzheimer mice. *Neurobiol Aging* 34:716–30. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22819136>
81. Cummings JL, Schneider E, Tariot PN, Graham SM (2006) Behavioral effects of memantine in Alzheimer disease patients receiving donepezil treatment. *Neurology* 67:57–63. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16832078>
82. Boxer AL et al. An open-label study of memantine treatment in 3 subtypes of frontotemporal lobar degeneration. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 23:211–7. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2760056&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
83. Boxer AL et al. (2013) Memantine in patients with frontotemporal lobar degeneration: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Neurol* 12:149–56. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3756890&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
84. Vercelletto M et al. (2011) Memantine in behavioral variant frontotemporal dementia: negative results. *J Alzheimers Dis* 23:749–59. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21157021>
85. Hodges JR (2013) Hope abandoned: memantine therapy in frontotemporal dementia. *Lancet Neurol* 12:121–3. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23305744>.
86. Lebert F, Stekke W, Hasenbroekx C, Pasquier F (2004) Frontotemporal dementia: a randomised, controlled trial with trazodone. *Dement Geriatr Cogn Disord* 17:355–9. Available at: <http://www.karger.com/Article/FullText/77171> [Accessed July 21, 2014].
87. Kumar A, Garg R Possible role of trazodone and imipramine in sleep deprivation-induced anxiety-like behavior and oxidative damage in mice. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 31:383–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19798453>.

Table 1: Behavior evaluation in transgenic mouse models of FTD.

Author / ref	target gene	nature of tg	protein aggregates	social behavior	disinhibition	depression	memory	other behavior	motor impairments
Yin 2010	PGRN	KO	ND	3 chamber test	elevated + maze	tail suspension forced swimming	MWM	ND	No
Kayasuga 2007 / Ghoshal 2012	PGRN	KO	ND	resident-intruder	open field		MWM	ND	No
Filiano 2012	PGRN	KO + haploinsufficiency	Yes	3 chamber test, tube test	ND	ND	MWM	cued fear conditioning	No
Petkau 2012	PGRN	KO	No	resident-intruder	open field	forced swimming	MWM, NOR, passive avoidance	ND	Yes
Tsai 2010	TDP-43	WT overexpression in cortex + hippocampus	Yes	ND	ND	ND	MWM, NOR, fear conditioning	ND	Yes
Swarup 2011	TDP-43	A315T G348C	Yes	ND	ND	ND	barnes maze, passive avoidance test	ND	Yes
Tatebayashi 2002 / Egashira 2014	tau	R406W	Yes	ND	LDB	forced swimming	contextual fear conditioning	cued fear conditioning	No
Dawson 2007	tau	N279K	Yes	ND	ND	ND	Radial arms water maze	ND	Yes
Lambourne 2007 / Reichelt 2013	tau	V337M	No	ND	ND	ND	ND	5-CSRTT, executive function	No
Levenga 2013	tau	P301L	Yes	ND	ND	ND	contextual fear conditioning	ND	Yes
Cook 2014	tau	neuronal, forebrain specific P301L	Yes	ND	open field, elevated + maze, LDB		contextual fear conditioning	cued fear conditioning	ND
Rodriguez-Ortiz 2013	VCP	Neuronal A232E	Yes	ND	ND	ND	MWM, NOR, fear conditioning	ND	ND

red=impaired behavior, green=normal behavior of the transgenic mice. MWM=Morris Water Maze, NOR=Novel Object Recognition, 5-CSRTT=5-Choices Serial Reaction Time Test, LDB=Light/Dark Box, ND=Not Determined.

Table 2: Clinical symptoms of FTD, related brain areas, corresponding tests and brain areas in mice.

Patients symptoms	Structure human	Structure mouse	Mouse test
disinhibition	Orbitofrontal cortex	Amygdala	Elevated plus maze Light dark box test Go/No Go 5 choices serial reaction time task
Apathy	Prefrontal cortex		Tail suspension test
Inertia	Basal ganglia		Forced swimming test
Loss of sympathy, empathy Theory of mind Emotion recognition	Frontotemporal cortex Temporoparietal networks Amygdala, insula	Anterior Cingulate Cortex	Observational fear learning 3 chamber sociability test
Perseverative, stereotyped compulsive behavior	Prefrontal cortex, Striatum Joseph 2008	striatum	Observation of stereotypy
Dietary changes Alcohol consumption	Hypothalamus Anterior Cingulate Cortex	Hypothalamus Amygdala Nucleus accumbens Anterior cingulate cortex	Sucrose preference Alcohol seeking
Executive deficit: Mental inflexibility	Frontal subcorticofrontal loops		Reversal learning
Spared episodic memory and spatial memory	Hippocampus Parietal lobe	hippocampus	Morris water maze Barnes maze Novel object recognition Fear learning

II. CHMP2B

A. Rôle physiologique de CHMP2B

1. Présentation de CHMP2B

Chez l'Homme, le gène *CHMP2B* est localisé sur le locus 12 du chromosome 3 et est composé de six exons. Il code une protéine de 213 acides aminés. Un transcrit alternatif est répertorié dans la base de donnée NCBI: ce variant perd une partie exonique dans la région 5' du gène et code une protéine de 172 acides aminés. Le gène est conservé dans de nombreuses espèces, notamment le chimpanzé, la souris, la drosophile et le nématode *C. elegans*. Chez la souris, il est localisé sur le chromosome 16 et un seul variant transcriptionnel a pour le moment été décrit. Il code une protéine de 213 acides aminés présentant 99% d'identité avec la protéine humaine. L'homologue de CHMP2B chez la levure, appelée VPS2 a été décrite pour la première fois comme un composant du complexe ESCRTIII (Endosomal Sorting Complex Required for Transport) en 2002 (Babst, Katzmann, Estepa-Sabal, Meerloo, & Emr, 2002). Au niveau de la structure primaire, VPS2 possède un enrichissement en acides aminés basiques dans la partie N-terminale et un enrichissement en acides aminés acides dans sa partie C-terminale. VPS2 forme un domaine en super hélice (coiled coil domain). La partie C-terminale possède un domaine MIM (Microtubule Interacting Motif) permettant l'interaction avec d'autres protéines (figure 3). Le domaine N-terminal est composé d'un domaine de quatre hélices alpha et est impliqué dans l'interaction avec les membranes et la polymérisation du complexe ESCRT-III (William Mike Henne, Buchkovich, Zhao, & Emr, 2012). La protéine présente une forte homologie avec les autres sous-unités du complexe ESCRTIII (William Mike Henne et al., 2012). CHMP2B joue un rôle clé dans l'invagination membranaire lors de son auto-assemblage avec les autres membres du complexe ESCRT-III pour former une structure tubulaire hélicoïdale (Bodon et al., 2011; Hanson, Roth, Lin, & Heuser, 2008).

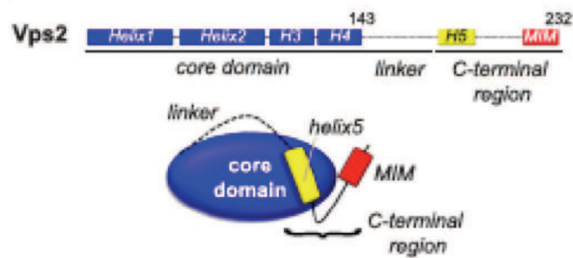


Figure 3: structure de la protéine Vps2 (William Mike Henne et al., 2012).

2. CHMP2B et le système ESCRT

La formation des corps multivésiculaires (CMV) est une étape clé de la dégradation des protéines membranaires via l'autophagie. Les CMV sont formés à partir de l'invagination de la membrane de l'endosome formant une vésicule intra-luminale. Le CMV fusionne ensuite avec le lysosome, permettant la dégradation des protéines et cargos du CMV. Cette invagination de la membrane vers l'intérieur de l'endosome est opérée par les complexes ESCRT, pour Endosomal Sorting Complex Required for Transport. Il existe cinq complexes ESCRT: ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II, ESCRT-III et Vps4, différents tant dans les protéines qui les composent que dans leur fonction. Ces complexes agissent à tour de rôle dans le processus de formation des vésicules intra-luminales. Ces protéines et leurs fonctions ont d'abord été découvertes et étudiées chez la levure mais elles sont maintenant beaucoup étudiées chez les animaux, notamment les mammifères.

La spécificité du système ESCRT tient dans le fait que l'invagination de la membrane se fait vers l'extérieur du compartiment cytosolique, que ce soit à l'intérieur du CMV ou de la vacuole ou bien à l'extérieur de la cellule lors de l'exocytose. Ainsi, le système ESCRT est impliqué dans d'autres fonctions cellulaires que la formation du CMV, telles que le bourgeonnement viral, l'exocytose, la fission cellulaire et la cytokinèse.

La figure 4, extraite de la revue de Henne et collègues, présente les composants moléculaires des complexes ESCRT avec la nomenclature chez les mammifères et chez la levure, ainsi que le rôle de chaque complexe dans différentes étapes de la machinerie ESCRT.






Complexes	Structure	Membrane Binding	Cargo Recognition	Intercomplex Interactions
Yeast: Human:				
ESCRT-0				
Vps27: Hrs Hse1: STAM1/2		with PtdIns3P via FYVE domain on Vps27	via UIM and VHS domains on both Vps27 and Hse1	to Vps23 (ESCRT-I) via a PTAP-like motif on Vps27 (ESCRT-0)
ESCRT-I				
Vps23: Tsg101 Vps28: hVps28 Vps37: Vps37A,B,C Mvb12: hMvb12A,B		weak electrostatics on N terminus of Vps37	via UEV domain on Vps23 and a novel UBD on Mvb12	to Vps27 (ESCRT-0) through UEV motif of Vps23 (ESCRT-I); to Vps36 (ESCRT-II) via the C terminus of Vps28 (ESCRT-I)
ESCRT-II				
Vps36: EAP45 Vps22: EAP30 Vps25: EAP20		with PtdIns3P GLUE domain of Vps36	via GLUE domain on Vps36	to Vps28 (ESCRT-I) via the GLUE domain of Vps36 (ESCRT-II); to Vps20 (ESCRT-III) through C terminus of Vps25 (ESCRT-II)
ESCRT-III				
Vps20: CHMP6 Snf7: CHMP4A,B,C Vps24: CHMP3 Vps2: CHMP2A,B		myristoylation of Vps20; electrostatics on helix-1 of CHMP3	interacts with DUBs to deubiquitinate cargo	to Vps25 (ESCRT-II) through helix-1 of Vps20 (ESCRT-III); to Vps4 through C-terminal MIM domains present on all four ESCRT-III subunits
Vps4 Complex				
Vps4: SKD1 Vps60: CHMP5 Vta1: LIP5				to MIM domains of ESCRT-III subunits via MIT domain

Figure 4 les complexes ESCRT (William M Henne, Buchkovich, & Emr, 2011).

a) ESCRT-0

ESCRT-0 est composé de deux sous unités: Hrs (hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate) et STAM1/2 (signal transducing adaptor molecule 1/2). La présence d'un domaine doigt zing sur Hrs permet le recrutement spécifique à la membrane de l'endosome. Les deux sous unités possèdent un site de liaison à l'ubiquitine, ce qui permet la liaison d'ESCRT 0 aux protéines ubiquitinées de la membrane de l'endosome. ESCRT 0 a ainsi un rôle d'initiation de la voie ESCRT dans la formation du CMV.

b) ESCRT-I

Quatre sous unités composent le complexe ESCRT-I: Tsg101, Vps28, Vps37 (4 isoformes existent chez les mammifères: Vps37A-D) et MVB12 (deux isoformes chez les mammifères: MVB12A-B). ESCRT-I ne se lie que faiblement à la membrane. Par contre, un domaine Ubiquitine E Variant sur Tsg101 lui permet d'interagir avec les cargots

ubiquitinés mais également avec le complexe ESCRT 0 via Hrs (William M Henne et al., 2011). ESCRT-I a donc un rôle d'intermédiaire entre la membrane de l'endosome et les protéines ubiquitinées.

c) ESCRT-II

ESCRT-II est un hétéro-tétramère composé des sous unités EAP45 et EAP30 et de deux sous-unités EAP20 (Teo, Perisic, González, & Williams, 2004). Il présente des similitudes avec le complexe ESCRT-0 et se lie lui aussi à la membrane de l'endosome. ESCRT-II interagit avec ESCRT-III et a donc pour rôles la liaison avec les autres complexes ESCRT, le renforcement de l'ancrage à la membrane et le recrutement d'ESCRT-III.

d) ESCRT-III

ESCRT-III est composé de quatre sous-unités principales qui sont les protéines CHMP (Charged multivesicular protein): CHMP2, CHMP3, CHMP4 et CHMP6. La particularité du complexe ESCRT-III est qu'il ne forme pas un complexe stable, contrairement aux autres complexes ESCRT, mais s'assemble lors du recrutement par ESCRT-II. Le désassemblage d'ESCRT-III est d'ailleurs une étape clé de la fission entre les membranes lors de la maturation des autophagosomes (Lee, Beigneux, Ahmad, Young, & Gao, 2007). La première étape de la formation du complexe est le recrutement de CHMP6 par EAP20 du complexe ESCRT-II à la membrane de l'endosome (Teo et al., 2004). CHMP4 est ensuite recruté et forme un homo-oligomère, puis CHMP3 vient former une coiffe sur cet homo-oligomère. Enfin, CHMP3 recrute CHMP2, complétant l'assemblage du complexe ESCRT-III. D'autres protéines adaptatrices s'ajoutent à ce complexe, notamment la protéine Alix (Apoptosis-linked gene-2 interacting proteine X). Le complexe ESCRT-III provoque l'invagination de la membrane en formant une structure hélicoïdale créant une zone de constriction (Bodon et al., 2011; Guizetti et al., 2011; William Mike Henne et al., 2012).

e) Le complexe Vps4

Vps4 est une AAA ATPase dont la fonction est de fournir l'énergie nécessaire à la dissociation de la membrane du complexe ESCRT-III. Vps4 s'assemble en un dodécamère composé de deux anneaux hexamériques. Vps4 est recrutée par CHMP2 et CHMP4 via l'interaction entre plusieurs domaines MIT (Microtubule Interacting and

Trafficking molecule domain) de Vps4 et les domaines MIM des CHMPs. La fonction ATPase de Vps4 est indispensable à son action de désassemblage du complexe et son dysfonctionnement maintient Vps4 à la membrane de l'endosome et provoque la formation d'endosomes abherants (Bishop & Woodman, 2000).

3. CHMP2B, un acteur de l'autophagie

L'autophagie est le processus par lequel des éléments cytoplasmiques sont dégradés par voie lysosomale (Figure 5). Contrairement au protéasome, l'autophagie cible des protéines à longue durée de vie et des organelles. L'autophagie joue également un rôle prépondérant dans la dégradation des agrégats protéiques impliqués dans de nombreuses maladies neurodégénératives (Vidal, Matus, Bargsted, & Hetz, 2014). Les cibles, ou cargos, sont ubiquitinés, ce qui correspond à un signal d'adressage de ceux-ci vers l'autophagosome. L'autophagosome est généré par la fermeture d'une structure membranaire sur une partie du cytoplasme contenant le cargo formant ainsi une vésicule à double membrane appelée autophagosome (figure 5). Cet autophagosome interagit avec la voie endosomale par la fusion avec à la fois des endosomes jeunes et des CMVs. Cette structure issue de la fusion d'un autophagosome et d'un CMV est appelée amphisome (figure 5). Elle fusionne alors avec un lysosome au contenu acide et riche en enzymes hydrolytiques. Les cargos sont alors dégradés par les enzymes lysosomales (Fader & Colombo, 2009). Bien que l'autophagosome puisse fusionner directement avec le lysosome, il semble que l'étape de fusion avec les CMV soit plus fréquente et représente une étape importante de la maturation autophagocytaire (Berg, Fengsrud, Stromhaug, Berg, & Seglen, 1998).

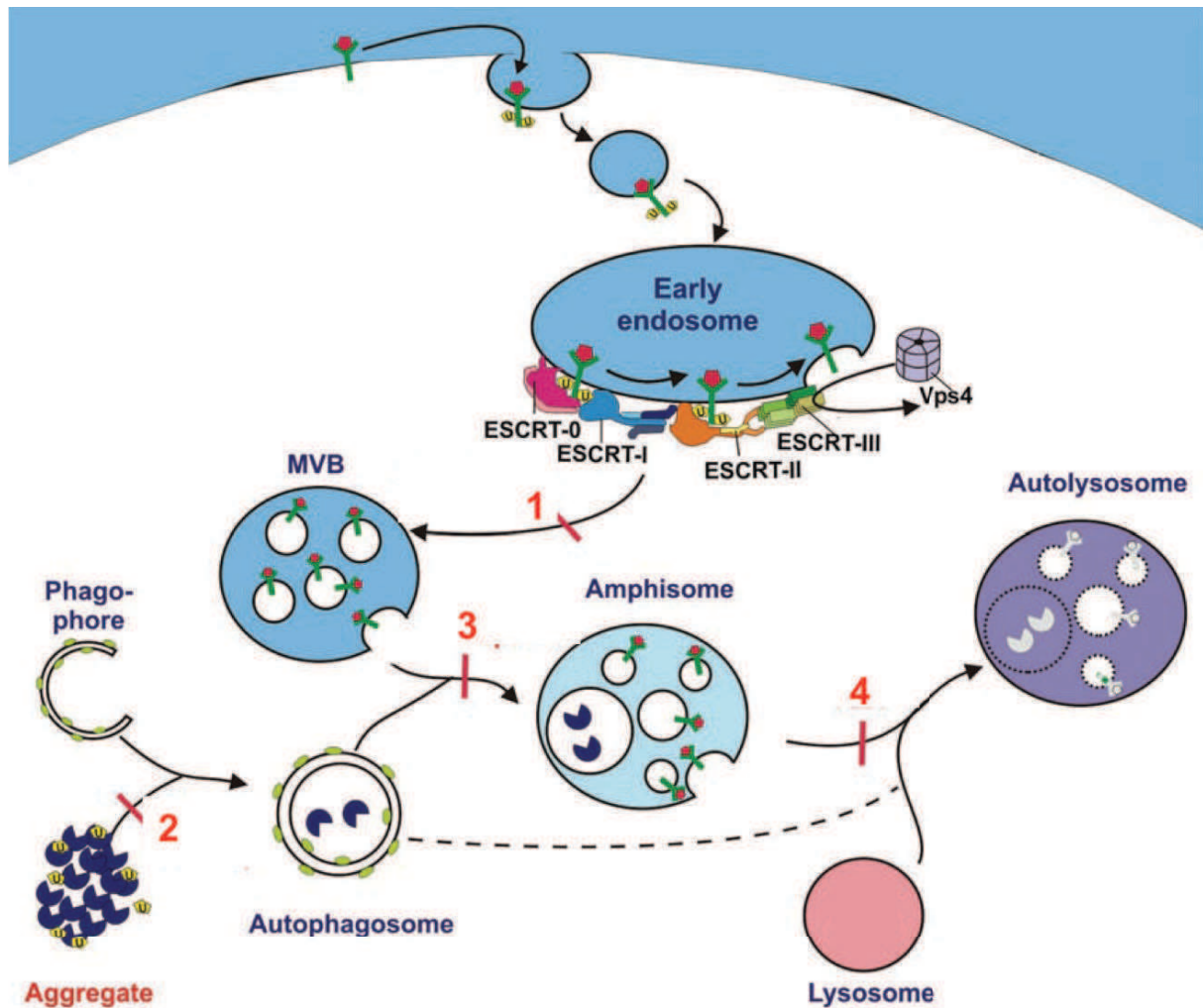


Figure 5 le système autophagique et son interaction avec le CMV (Rusten & Simonsen, 2008).

1. Le système ESCRT recrute les cargos ubiquitinés à la membrane de l'endosome et forme le CMV.
 2. les agrégats de protéines ubiquitinées sont pris en charge dans l'autophagosome. 3.
 L'autophagosome et le CMV fusionnent, formant ainsi un amphisome. 4. Cet amphisome fusionne
 avec le lysosome formant ainsi un autolysosome où a lieu la dégradation des protéines et des
 cargos. MVB=Multivesicular Body=CMV

Lors du processus d'autophagie, le système ESCRT, par l'intermédiaire de ESCRT-0, ESCRT-I et ESCRT-II, va reconnaître ces cargos via l'ubiquitine et permettre leur dégradation. En effet, les complexes ESCRT-0, ESCRT-I et ESCRT-II possèdent plusieurs sites de liaison à l'ubiquitine et se lient aux protéines poly-ubiquitinées. Cela confère au système ESCRT un rôle de reconnaissance et d'accumulation des cibles de l'autophagie, via le CMV. De plus, de nombreuses études montrent un rôle de régulation de l'autophagie du système ESCRT. Une étude publiée en 2007 utilisant des cultures de cellules HeLa a montré que l'autophagie est inhibée lorsque le système ESCRT est non fonctionnel (Filimonenko et al., 2007; Rusten, Filimonenko, Rodahl, Stenmark, &

Simonsen, n.d.). L'inhibition par SiRNA des sous unités Hrs, Tsg101 ou CHMP3 des complexes ESCRT-0, ESCRT-I et ESCRT-III respectivement conduit à l'accumulation de protéines ubiquitinés et d'autophagosomes (Filimonenko et al., 2007). L'expression d'une forme mutée de CHMP2B du complexe ESCRT-III, CHMP2B^{intron5} conduit aux mêmes dommages cellulaires dans cette étude. De plus, d'un point de vue fonctionnel, ces altérations empêchent la dégradation des agrégats à polyglutamine dans un modèle de Huntington (Filimonenko et al., 2007). Plusieurs études suggèrent qu'ESCRT et plus particulièrement CHMP2B participe à la fusion des autophagosomes avec le lysosome. Dans des cultures primaires de neurones murins et chez la drosophile, l'inhibition de mSNF7 (ou CHMP4) ou l'expression du mutant CHMP2B^{intron5} conduit à l'accumulation d'autophagosomes par l'inhibition de leur fusion avec le lysosome (Lee et al., 2007). De plus, une étude publiée en 2010 montre que CHMP2B recrute la protéine Rab7 lors de la fusion de l'autophagosome et du lysosome et que ce recrutement est une étape nécessaire à cette fusion (Urwin et al., 2010).

4. Rôle de CHMP2B et d'ESCRT dans l'exocytose

La fonction particulière de déformation des membranes des complexes ESCRT, et en particulier ESCRT-III, leur confère un rôle dans différents processus cellulaires. Le rôle d'ESCRT dans le bourgeonnement extracellulaire du virus HIV-1 (Human Immunodeficiency virus-1) a été démontré en 2001. Depuis, le rôle des ESCRTs a été montré dans le bourgeonnement de nombreux virus. Les sites de liaison à l'ubiquitine de tsg101 (ESCRT-I) et Alix semblent être le moyen de recrutement de plusieurs virus, notamment HIV-1. Contrairement à la formation des CMV, le bourgeonnement viral ne nécessite pas l'intervention des complexes ESCRT-0 et ESCRT-II. La protéine Alix, partenaire de CHMP2B et du complexe ESCRT-III recrute le complexe ESCRT-III, responsable de la déformation membranaire et de l'exocytose virale.

5. Rôle de CHMP2B et d'ESCRT dans la formation et la plasticité des épines dendritiques

Les épines dendritiques sont des protubérances membranaires sur les dendrites des neurones. Elles forment les parties post synaptiques des synapses excitatrices interneuronales et contiennent les récepteurs aux neurotransmetteurs.

Les épines dendritiques sont formées et maintenues à partir de l'exocytose d'endosomes (Park et al., 2006). Etant donné le rôle d'ESCRT et CHMP2B dans le trafic membranaire des endosomes d'une part et dans l'exocytose d'autre part, il est plausible qu'ils aient un rôle dans la formation et le maintien des épines dendritiques. Cette hypothèse est étayée par une étude montrant que l'inhibition de CHMP2B par SiRNA ou l'expression du mutant CHMP2B^{intron5} altère la structure et la fonction des épines dendritiques (Belly et al., 2010). L'étude montre que la perte de fonction de CHMP2B dans des cellules hippocampiques induit la formation d'épines immatures n'atteignant pas leur forme caractéristique de champignon ainsi qu'une diminution de l'activité synaptique.

B. CHMP2B et neurodégénérescence

1. Les mutations CHMP2B dans la SLA et la DFT

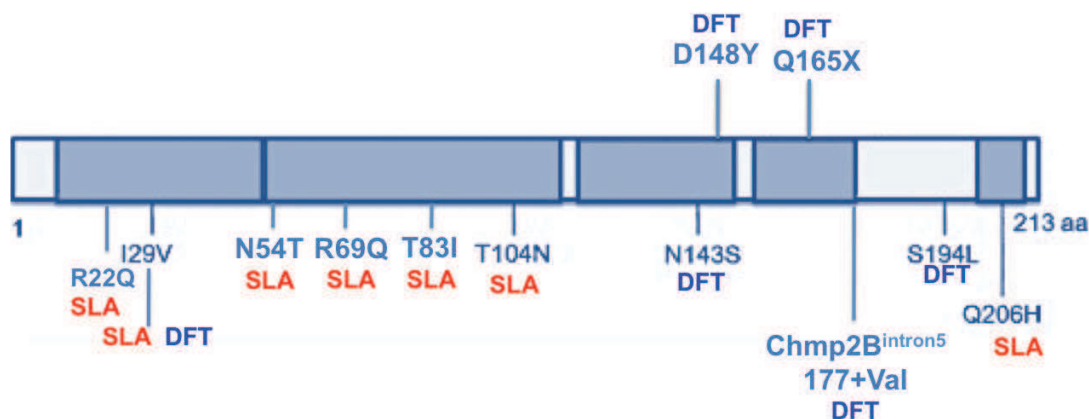


Figure 6: Répartition des mutations sur la protéine CHMP2B

Depuis 2005, douze mutations ont été identifiées, dont six chez des patients SLA, cinq chez des patients DFT et une chez un patient SLA-DFT. Ces mutations sont réparties sur toute la séquence de la protéine CHMP2B.

Douze mutations sur CHMP2B ont été découvertes chez des patients SLA ou DFT. Comme illustré sur la figure 6, les mutations sont réparties sur toute la séquence de la protéine. Cependant les mutations les plus délétères sont situées dans la partie C-terminale de celle-ci.

En 2005, la première mutation sur le gène *CHMP2B*, la mutation CHMP2B^{intron5} a été découverte dans une famille danoise de DFT, définie comme une DFT-3 (Skibinski et

al., 2005). L'étude des cas de cette famille nombreuse a montré une co-ségrégation de la mutation avec l'apparition de DFT, démontrant l'aspect délétère de la mutation. Suite à la découverte de la mutation CHMP2B^{intron5}, des recherches de mutations sur CHMP2B ont été réalisées sur de grandes cohortes de patients. Une autre mutation provoquant la perte de la partie C-terminale de CHMP2B, la mutation CHMP2B^{Q165X} a été découverte dans une famille de patients DFT (van der Zee et al., 2008) et co-ségrège avec l'apparition de la maladie. Cette mutation provoque également l'accumulation de structures de type endosomes de forme et de taille aberrantes dans des cellules en culture (van der Zee et al., 2008). D'autres mutations provoquant une substitution d'acide aminé dans la partie C-terminale de CHMP2B ont de plus été décrites chez deux patients DFT (Skibinski et al., 2005; van der Zee et al., 2008), mais la pathogénicité de ces mutations reste à prouver, tant au niveau fonctionnel que clinique. Deux études publiées en 2006 portant sur le séquençage de CHMP2B chez des patients DFT, SLA-DFT et SLA ont mis en évidence deux nouvelles mutations: CHMP2B^{A623C}, chez un patient atteint de SLA, et CHMP2B^{A85G} chez un patient SLA et un patient présentant des symptômes de SLA et de DFT (Parkinson et al., 2006; Rizzu et al., 2006). Une étude sur une cohorte de patients SLA, publiée en 2010 a retrouvé la mutation A623C chez un patient et la mutation A85G chez deux patients et a identifié une nouvelle mutation (CHMP2B^{C311A}) (L. E. Cox et al., 2010). Cette dernière étude démontre un effet pathogène des mutations A623C, A85G et C311A sur des cellules en culture, se traduisant par une accumulation de vacuoles cytoplasmiques et des défauts de fonctionnement du lysosome et de l'autophagie. La mutation A623C provoque une substitution d'acide aminé dans le domaine C-terminal de la protéine, sur le site très conservé de liaison à Vps4. Vps4 étant l'acteur clé du désassemblage du complexe ESCRT-III, ceci est en accord avec la théorie selon laquelle un défaut de désassemblage du complexe ESCRT-III est à l'origine de l'accumulation d'autophagosomes dans le cas de la mutation intron5 (Lee et al., 2007).

La présence de ces mutations chez plusieurs patients non apparentés et leur absence dans les cas contrôles, ainsi que les études fonctionnelles menées en culture, suggèrent une causalité de ces mutations dans les cas de SLA et de DFT. Cependant, seules des études de co-ségrégation des mutations avec la pathologie pourraient confirmer une relation de cause à effet. Il n'est donc pas exclu que ces mutations sur

CHMP2B représentent des facteurs de risque et non des mutations délétères. De plus, les mutations CHMP2B demeurent rares chez les patients DFT, SLA-DFT et SLA. Il est à noter que les patients SLA porteurs de mutations CHMP2B développent préférentiellement une SLA de type spinale (L. E. Cox et al., 2010).

2. La mutation CHMP2B^{intron5}

La première mutation sur CHMP2B a été découverte dans une famille danoise de DFT associée au chromosome 3 (Skibinski et al., 2005). L'étude des cas de cette famille nombreuse a montré une co-ségrégation de la mutation et de l'apparition de DFT, démontrant l'aspect délétère de la mutation. La mutation porte sur une substitution G à C dans le site accepteur d'épissage de l'exon 6. Cela conduit à l'intégration d'une partie de l'intron 5 dans la séquence codante du gène CHMP2B ou à la délétion d'une partie de l'exon 6 et a pour conséquence la formation de deux transcrits alternatifs: CHMP2B^{intron5} et CHMP2B^{Δ10}. Dans les deux cas le cadre de lecture est décalé, provoquant la disparition des 36 acides aminés en position C-terminale, remplacés par un résidu valine pour CHMP2B^{intron5} ou une séquence aberrante de 29 acides aminés pour CHMP2B^{Δ10} (Skibinski et al., 2005). L'expression des deux transcrits a été quantifiée et correspond à 35% et 10% du niveau de l'ARNm sauvage pour CHMP2B^{intron5} et CHMP2B^{Δ10} respectivement (Urwin et al., 2010). D'un point de vue clinique, les patients DFT-3 développent le variant comportemental classique de la DFT, avec un changement de personnalité: désinhibition, perte d'empathie et comportements déplacés (Gydesen et al., 2002; Lindquist, Braedgaard, Svenstrup, Isaacs, & Nielsen, 2008). Une apathie peut apparaître avec le temps et la progression de la maladie. Des signes moteurs ont été observés au cours de la progression de la maladie, notamment des signes de parkinsonisme et des symptômes pyramidaux, mais aucun signe d'atteinte motoneuronale corticale ou spinale n'a été rapporté. Le grand nombre de patients et de contrôles de cette famille a permis des études pré-symptomatiques sur des porteurs de la mutation. De légers défauts de mémoire de travail et des fonctions exécutives ont été décrits chez des patients pré-symptomatiques (Stokholm et al., 2013). Ceci peut être mis en corrélation avec les résultats d'une étude montrant que les personnes porteuses de la mutation présentent une atrophie généralisée du cerveau à un stade pré-symptomatique (Rohrer et al., 2009). A des stades symptomatiques, ces patients présentent une hypoperfusion cérébrale dans les lobes occipitaux et pariétaux (Lunau et

al., 2012). L'étude histopathologique des patients CHMP2B^{intron5} a montré l'accumulation d'agrégats positifs pour l'ubiquitine et pour p62 mais négatifs pour TDP-43, classant ces cas dans les DFT associées au système "unfolded protein system" (FTLD-UPS) (Holm, Englund, Mackenzie, Johannsen, & Isaacs, 2007). Une astroglie a également été décrite. D'un point de vue fonctionnel, il semble que cette mutation affecte la voie endosomale-lysosomale. En effet, une accumulation d'endosomes en stade tardif a été observée dans des neurones du cortex frontal de patients porteurs de la mutation (Urwin et al., 2010). De plus, dans la même étude, une accumulation d'endosomes tardifs correspondant à des CMV dysmorphiques a également été observée dans des cultures primaires de fibroblastes de patients. La sur-expression de CHMP2B^{intron5} et dans une moindre mesure de CHMP2B^{delta10} dans différents modèles cellulaires entraîne une accumulation d'endosomes tardifs (Skibinski et al., 2005; Urwin et al., 2010; van der Zee et al., 2008) ou d'autophagosomes et inhibe la dégradation des CMV par autophagie (Filimonenko et al., 2007; Lee et al., 2007). L'étude de Lee et collègues montre que la neurodégénérescence induite par CHMP2B^{intron5} est due à un défaut de désassemblage du complexe ESCRT-III, empêchant la fusion entre l'autophagosome et le lysosome (Lee et al., 2007). Une autre possibilité pour expliquer la pathogénicité de cette mutation serait l'existence d'un défaut de formation et de maturation des épines dendritiques, comme le montre une étude de Belly et collaborateurs lors d'une surexpression de CHMP2B^{intron5} dans des neurones hippocampiques (Belly et al., 2010). Ces données sont en accord avec les données de Lee et collaborateurs qui montrent une rétraction des épines dendritiques précédant la mort cellulaire dans leur modèle.

En 2012, l'effet de la mutation CHMP2B^{intron5} a été étudié *in vivo* dans un modèle murin exprimant cette mutation sous le contrôle du promoteur du prion (Ghazi-Noori et al., 2012). Les souris développent des inclusions protéiques neuronales dans différentes zones du cerveau, notamment dans le cortex, le corps calleux, le tronc cérébral et dans les motoneurones de la moelle épinière. Ces inclusions sont positives pour l'ubiquitine et p62 et négatives pour TDP-43, de façon homologue aux patients. Une astroglie a également été observée dans les mêmes aires chez ces animaux. De façon intéressante, les auteurs n'observent pas ces marqueurs histopathologiques sur une lignée surexprimant la forme sauvage humaine de CHMP2B ni sur une lignée où l'extinction de CHMP2B a été réalisée. Ils montrent ainsi que c'est bien l'expression du mutant CHMP2B^{intron5} qui est responsable du phénotype pathologique observé. Les auteurs

rapportent également une survie diminuée mais aucune atteinte au niveau moteur ni au niveau du comportement n'est décrite.

3. Le rôle de CHMP2B dans les maladies neurodégénératives

En plus de son rôle dans des cas de patients SLA et DFT, CHMP2B pourrait avoir un rôle dans le développement d'autres maladies neurodégénératives. En effet, la protéine CHMP2B a été identifiée dans les corps de Lewi et dans des inclusions cytoplasmiques gliales de cerveaux de patients atteints de la maladie de Parkinson et de maladie incidente à corps de Lewi (Kurashige et al., 2012) ainsi que dans des alpha-synucléopathies (Tanikawa et al., 2012). De plus CHMP2B a également été identifié comme un marqueur des structures granulovacuolaires caractéristiques de la maladie d'Alzheimer, dans l'hippocampe et le cortex de patients atteints d'Alzheimer (Funk, Mrak, & Kuret, 2011; Yamazaki et al., 2010). Par ailleurs, comme indiqué dans la section II. A. 3, des études fonctionnelles ont montré l'importance du système ESCRT et de la voie endosomale lysosomale dans le processus d'accumulation d'inclusions, typiques des processus neurodégénératifs. L'inhibition du complexe ESCRT favorise l'accumulation d'inclusions de huntingtine à poly-glutamine dans un modèle *in vitro* de maladie de Huntington (Filimonenko et al., 2007).

III. Problématique et objectif de thèse

La SLA et la DFT sont deux maladies dévastatrices, chacune à sa manière. Pour les patients, un diagnostic de SLA signifie une paralysie progressive conduisant à une perte d'autonomie en quelques mois et la mort en 3 à 5 ans. C'est une véritable douche froide pour des personnes le plus souvent dans la force de l'âge et en activité. La DFT est une démence progressive affectant la personnalité des patients et les déconnectant de toute relation sociale. Cette maladie est particulièrement éprouvante pour les proches, qui ne reconnaissent plus leur parent ou leur conjoint et doivent leur apporter une attention constante. SLA et DFT touchent en tout environ 11000 personnes en France. Etant donné l'impact de la SLA et de la DFT sur les malades et sur leur entourage, réussir à comprendre et traiter ces pathologies est un enjeu crucial. Pourtant, à ce jour, aucun traitement ne permet de soigner la SLA ni la DFT.

SLA et DFT peuvent sembler éloignées de prime abord, car les symptômes sont très différents. Pourtant elles partagent des caractéristiques communes. D'une part, un grand nombre de patients développe les deux maladies: en effet, 30% des patients initialement diagnostiqués pour une SLA vont développer une DFT au cours de la SLA, et 15% des patients DFT vont développer une SLA. Ensuite, SLA et DFT ont un socle génétique commun. Ceci a été rendu évident par la découverte de l'implication du gène C9orf72, responsable de 50% des SLA familiales et de 15% des cas familiaux de DFT, mais cinq autres gènes sont également impliqués dans la SLA et la DFT. Enfin, SLA et DFT partagent des marqueurs histopathologiques communs. Les patients développent des inclusions cytoplasmiques neuronales et la protéine TDP-43 est retrouvée dans ces inclusions dans 98% des cas de SLA et 45% des cas de DFT. Dans ce contexte comment expliquer que dans certains cas les motoneurones de la moelle épinière et les NMC soient les cibles spécifiques de la neurodégénérescence, alors que dans d'autres cas, les neurones du cortex préfrontal sont principalement touchés? Les études ont à ce jour échoué à répondre à cette question.

Les modèles animaux basés sur l'expression de formes mutées de gènes associés à ces deux maladies ont permis de considérables avancées dans la compréhension du fonctionnement des protéines impliquée et ont permis de formuler de nombreuses hypothèses quand aux mécanismes pathologiques. Pourtant, à ce jour, de nombreuses molécules agissant sur ces mécanismes ont été testées chez les patients et aucune n'a montré de résultat positif, ce qui indique que les mécanismes ciblés ne suffisent pas à expliquer la maladie. Les modèles animaux de la SLA ou de la DFT sont, par nécessité, basés sur une cause très spécifique: une mutation particulière sur un gène de la SLA ou de la DFT. Ils ne peuvent donc pas être représentatifs de tous les patients. Il est donc important de discerner les atteintes spécifiques aux modèles, qui ne sont pas nécessairement pathogènes chez le patient, des mécanismes mis en jeu de façon générale et communs à un grand nombre de patients, ceux-ci étant plus susceptibles d'être de vraies causes pathogènes. Ainsi, l'étude des différents modèles doit se faire de façon complémentaire et non concurrente, et ces modèles doivent couvrir de la façon la plus large possible le continuum SLA-DFT. Malgré le lien reconnu entre SLA et DFT, très peu d'études ont cherché à modéliser la co-occurrence des deux pathologies. Comprendre les mécanismes communs entre SLA et DFT est peut être pourtant la clé pour expliquer

ces maladies et trouver des cibles thérapeutiques. C'est dans cette optique que le laboratoire a voulu développer un modèle de SLA-DFT.

En 2005, une mutation délétère sur le gène *CHMP2B* a été découverte dans une famille de DFT danoise et la découverte d'autres mutations chez des patients atteints de DFT et de SLA a rapidement suivi. Le gène *CHMP2B* a ainsi été le premier lien génétique entre SLA et DFT. Le laboratoire dans lequel j'ai réalisé mon travail de thèse a donc choisi d'exprimer chez la souris la mutation *CHMP2B*^{intron5} afin d'étudier son impact pathologique dans la SLA et la DFT. Cette lignée de souris a été générée en collaboration avec deux laboratoires: le laboratoire du Pr. Rémy Sadoul à l'Institut des Neurosciences à Grenoble a réalisé le transgène et l'équipe du Dr. Laurent Schaeffer dans le laboratoire de Biologie Moléculaire de la Cellule à Lyon a créé la lignée de souris transgéniques.

Mon travail de thèse a été de caractériser cette lignée de souris, dans le but de savoir si celle-ci développe des caractéristiques de SLA et de DFT et si elle peut constituer un bon modèle d'étude des mécanismes communs entre SLA et DFT. Pour cela j'ai eu une approche histopathologique, avec la recherche de marqueurs de SLA-DFT dans le cerveau, la moelle épinière et le muscle, et une approche comportementale avec l'étude du phénotype moteur et du phénotype cognitif et social de ces animaux.

En parallèle de ce travail, j'ai collaboré à un projet développé dans le laboratoire qui a porté sur le rôle du co-activateur transcriptionnel PGC-1 α et la régulation mitochondriale dans un modèle murin de neuropathie. Ce projet a donné lieu à une publication qui sera présentée en dernière partie des résultats (Rona-Voros et al., 2013).

Les résultats de cette thèse sont présentés en trois parties:

- La première partie est constituée de la première publication en cours de rédaction présentant cette nouvelle lignée. Elle traite de la caractérisation histopathologique des souris *CHMP2B*^{intron5} ainsi que de leur caractérisation comportementale au niveau des capacités motrices et de certains aspects de démence.
- La deuxième partie traite de la caractérisation du comportement des souris sur le plan cognitif.

- La troisième partie est constituée de la deuxième publication. Elle traite de l'effet protecteur de la prolifération mitochondriale induite par PGC-1 α dans un modèle murin de neuropathie.

Résultats

I. Publication 1: A transgenic mouse expressing CHMP2B^{intron5}

mutant in neurons develops histological and behavioral features of

Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Dementia.

La SLA et la DFT sont deux maladies neurodégénératives touchant les adultes. La SLA provoque la mort des MN et une faiblesse musculaire progressive aboutissant à la mort des patients en 3 à 5 ans. La DFT est caractérisée par une atrophie des lobes frontaux et temporaux du cortex, associée à des changements progressifs de la personnalité et du comportement social. Alors qu'elles ont longtemps été considérées comme deux maladies distinctes, il est aujourd'hui reconnu que la SLA et la DFT forment un continuum au niveau clinique, génétique et histopathologique. Des mutations sur six gènes sont associés à la fois à la SLA et à la DFT. Plus particulièrement, des mutations dans le gène CHMP2B sont associées à la fois à des cas de SLA, de DFT et de SLA-DFT. L'étude de modèles murins transgéniques de la SLA et de la DFT a permis de grandes avancées dans la connaissance des altérations liées à ces pathologies. Cependant, à ce jour, les causes et les mécanismes de la neurodégénérescence associées à la SLA et à la DFT ne sont pas clairement établis. Afin d'étudier les mécanismes communs à la SLA et à la DFT, nous avons généré un modèle de souris transgéniques basé sur l'expression neuronale de la mutation humaine CHMP2B^{intron5}.

Ces souris présentent des altérations progressives de la force musculaire et de la coordination motrice. Au niveau de l'axe moteur, les JNM ont une morphologie anormale et sont partiellement dénervées, le diamètre axonal est réduit dans le nerf sciatique, cependant, aucune perte de MN n'a été observée. En plus de ces symptômes moteurs, les souris transgéniques développent des modifications du comportement reproduisant des symptômes de la DFT. Il s'agit de changements du comportement alimentaire, de désintérêt social et de stéréotypies. De plus, nous avons observé dans les neurones des agrégats contenant de l'ubiquitine et p62, mais ils sont négatifs pour TDP-43. Une astrocytose a également été observée. Ceci reflète le profil histopathologique des patients porteurs de la mutation CHMP2B^{intron5}.

Ces données montrent que l'expression neuronale de CHMP2B^{intron5} induit un phénotype moteur associé à des symptômes de démence et à des marqueurs

histopathologiques de la SLA et de la DFT. Ces souris constituent donc un outil pour comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires causant la démence et la dénervation dans le syndrome SLA-DFT.

A transgenic mouse expressing CHMP2B^{intron5} mutant in neurons develops histological and behavioral features of Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Dementia.

Aurelia Vernay^{1,2}, Ludivine Therrault^{1,2}, Béatrice Blot³, Valérie Risson⁴, Sylvie Dirrig-Grosch^{1,2}, Thiebault Lequeu^{1,2}, Laurent Schaeffer⁴, Rémy Saddoul³, Jean-Philippe Loeffler^{1,2*} and Frédérique René^{1,2*}

1 : INSERM, U1118, Mécanismes Centraux et Périphériques de la Neurodégénérescence, Strasbourg, France.

2 : Université de Strasbourg, UMRS1118, Faculté de Médecine, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg, Strasbourg, France.

3 : Inserm U836, Grenoble Institut des Neurosciences, Université Joseph Fourier, Grenoble, France.

4: Laboratoire de Biologie Moléculaire de la Cellule, UMR5239 CNRS/ENS Lyon/UCBL/HCL Ecole normale supérieure de Lyon, Lyon, France.

• *Corresponding authors:*

Jean-Philippe LOEFFLER: loeffler@unistra.fr, phone (+33) 368853081, fax (+33) 368853065

Frédérique RENE, frederique.rene@unistra.fr, phone (+33) 368853086, fax (+33) 368853065

En préparation pour Acta Neuropathologica

ABSTRACT

Mutations in the charged multivesicular body protein2B (CHMP2B) are associated with both amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and frontotemporal dementia (FTD) and with a mixed ALS-FTD syndrome. To model this syndrome we generated a transgenic mouse line expressing the Chmp2B^{intron5} mutant in a neuron specific manner. These mice presented with reduced life span. They developed progressive motor and behavioral alterations reminiscent of both ALS and FTD and died prematurely, due to generalized paralysis. A longitudinal study revealed progressive gait abnormalities associated with cramping and reduced muscle strength and motor coordination. Interestingly when paralyzed, although signs of denervation are present as attested by altered EMG profiles, reduction in size and innervation of the neuromuscular junctions and by a decrease of sciatic nerve axons diameters, spinal motoneurons cell bodies are preserved until death. In addition to the motor alterations, Chmp2B^{intron5} mice progressively developed FTD-relevant behavioral modifications such as compulsivity, changes in food preferences, restlessness and decrease in social interactions. Immunohistochemistry showed CHMP2B^{intron5} and ubiquitin-positive inclusions often associated with p62 in neurons but negative for TDP-43. Moreover, astrogliosis developed with age. These data indicate that CHMP2B^{intron5} neuronal expression induces a motor phenotype associated with dementia symptoms and with histopathological hallmarks of ALS and FTD. Altogether, these data show that mutated CHMP2B^{intron5} protein affects areas involved in motor and cognitive functions. These mice will help to understand the molecular and cellular neurodegenerative mechanisms leading to dementia and denervation in the ALS-FTD syndrome.

Key words: Frontotemporal Dementia, Amyotrophic Lateral Sclerosis, Chmp2B, behavior, denervation, protein inclusions.

INTRODUCTION

Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) and Frontotemporal Dementia (FTD) are two fatal neurodegenerative diseases belonging to the same patho-physiological continuum. ALS is the most frequent adult-onset motorneuron disease and has an incidence rate equivalent to Multiple Sclerosis. It is characterized by a progressive muscle weakness evolving to paralysis, due to the gradual loss of skeletal muscle innervation associated with the degeneration of upper and lower motoneurons. FTD, also referred to as frontotemporal lobar degeneration, is the second most common cause of dementia in people under the age of 65 years after Alzheimer disease [1]. It is characterized by the atrophy of the frontal and/or temporal cortices of the brain. These anatomical modifications are associated with behavioral changes and cognitive impairments such as alterations in personal and social conduct (ie apathy and/or disinhibition, stereotyped or compulsive behavior, alteration in food preference or appetite) occasionally associated with parkinsonism [2].

Although traditionally considered as distinct entities, it recently emerged that ALS and FTD share overlapping genetic causes, common physiopathological features and lie on a clinical, pathological and genetic continuum [3]. Approximately 15% of FTD patients develop ALS and 10-20% of ALS patients develop FTD [4] [5] [6] [7] [8]. In addition to this clinical overlap, ALS and FTD share common histopathological hallmarks such as neuronal ubiquitinated inclusions [9].

Both ALS and FTD can be of familial (10% and 30% respectively) or sporadic origin and several genes have been related to ALS, FTD or ALS-FTD. In the last seven years, several mutated genes such as *chromatin-modifying protein 2 (CHMP2B)* [10], *TARDBP* [11], *fused in sarcoma (FUS)* [12], *valosin-containing protein (VCP)* [13] or *C9orf72* [14] [15] have been identified in ALS-FTD families. All these genes are related to RNA processing or protein degradation. Although the damaged areas of the CNS and the genetic causes are heterogeneous among patients, the common cellular targets are the neurons. *CHMP2B* was the first identified gene associated with both pathologies [10]. *CHMP2B* is a member of the chromatin-modifying protein/charged multivesicular body protein family. As a component of the endosomal sorting complex required for transport III (ESCRTIII) multi-protein complex, *CHMP2B* is involved in vesicular trafficking, autophagy [16] [17] [18] and dendritic spines formation [19]. In 2005, the *CHMP2B*^{intron5} mutation was discovered in a large Danish family of FTD. This mutation is a missense mutation in the splice acceptor site of exon 6 that leads to the transcription of two aberrant mRNA both translated in a truncated protein lacking 36

amino acids of the C-terminal part [20]. Since then, eleven new mutations in this gene have been found in ALS [10] [21][22], FTD [20] [23] [24] [25] and ALS-FTD [10] patients, supporting the idea of a pathological continuum. These mutations are disseminated all over the sequence, irrespective of the considered pathology. However, the c-terminal region deleted with the CHMP2B^{intron5} mutation also contained point mutation sites found in ALS [10] [21] and DFT [20] [25] patients suggesting a common contribution of this region in both pathologies. To date, it is still unknown how mutations in the same gene can lead to patients with distinct symptoms, ranging from pure muscle wasting in ALS to pure dementia in FTD. To determine whether the overexpression of the Chmp2B^{intron5} mutant in neurons can provoke ALS and/or FTD, we generated a transgenic line expressing this mutant under control of the mouse Thy1.2 promoter. Previously, Ghazi-Noori et collaborators reported a transgenic line expressing the same CHMP2B mutant under control of the hamster prion promoter that only exhibits progressive accumulation of protein aggregates without motor or behavioral changes. Here we report a transgenic mouse line expressing the CHMP2B^{intron5} mutant in neurons that develops clinical and histopathological hallmarks of both ALS and FTD including gait abnormalities, motor function alterations, and stereotypies at the behavioral level, NMJs abnormalities astrocytosis and neuronal inclusions in central nervous system at the cellular level. Taken together, these data show that a mutation of Chmp2B, a protein involved in endocytic trafficking and autophagic clearance of cellular protein, can induce ALS and FTD. These data further support the hypothesis of a mechanistic continuum from motor neuron disease to dementia. As the first mouse model of ALS-FTD, this line will be of great interest to investigate common processes acting in ALS and FTD.

Materials and Methods

Ethics statement

All experiments followed current European Union regulations (Directive 2010/63/EU). They were approved by the regional ethics committee CREMEAS 35 under No. AL/51/58/02/13 and were performed by authorized investigators.

Generation of Chmp2B^{intron5} transgenic mice.

A cDNA encoding the N-terminal HA-tagged human CHMP2B^{intron5} mutant was generated by PCR and has been described in details earlier [19]. This cDNA was subcloned into the Xho I site in the mouse Thy1.2 promoter construct (generous gift from Dr. P. Caroni, [26]). The

linearized Not I- Pvu I fragment was purified and injected into single cell eggs of FVB/N mice breed with B6D2 males. The injected eggs were cultured to the two-cell stage and then surgically transferred to recipient. Of three series of microinjections, we obtained one male founder. F1 was obtained by breeding the founder with C57Bl6 females. The line was then propagated on this mix background. Hemizygous mice were interbred to obtain wild type (WT) hemizygous (HE) and homozygous (HO) mice in the same litter. In all the experiments, littermates were used for comparisons.

Genotyping and transgene copy number evaluation

Transgenic (Tg) mice were identified by PCR amplification of DNA extracted from tail biopsies.

Determination of transgen copy number was performed using the protocol described by Joshi et al., [27] with the following modifications: genomic DNA was extracted from the tail of WT, HE and HO mice with the phenol/chloroform method, followed by an ethanol precipitation and dissolution in Tris buffer. The linear fragment of 1079bp containing the transgene was obtained by digestion with the restriction enzymes Afl2 and NsiI and purified with the InVitrogen gel extraction kit (Invitrogen). The molecular mass of the fragment was calculated using the formula: $m=(1079bp \times 607.4 + 157.9) / 6.02 \cdot 10^{23}$. A dilution gamme of the fragment was prepared in Tris buffer plus 20ng/ μ L of genomic DNA from a WT mouse. The transgene copy number was estimated by quantitative PCR (SSoAdvanced SYBR® green Supermix BIO-RAD, CFX96 Real-Time System, BIO-RAD), by comparing the cycle threshold of 100ng of genomic DNA from transgenic mice with the plasmid fragment standard curve. CHMP2B^{intron5} copy number per diploid cell was calculated by dividing the number of copies measured by $1.67 \cdot 10^4$, the number of diploide cells corresponding to 100ng DNA.

Breeding and maintenance

Transgenic mice were housed in the animal facility of the faculty of medecine of Strasbourg University, at 23°C with a 12 hours light/dark cycle. They had water and regular A04 rodent chow *ad libitum*. For survival experiments, mice were euthanized when animals were paralyzed and unable to roll over within 10 s after being pushed on their back.

Phenotypic evaluation

All transgenic offspring were evaluated alongside their age and sex-matched non transgenic littermates.

General assessment: Mice were weighted monthly. To grossly characterize the phenotype of the mice, they were subjected to a modified SHIRPA (SmithKline Beecham, Harwell, Imperial College School of Medicine at St Mary's; Royal London Hospital, St Bartholomew's and the Royal London School of Medicine; Phenotype Assessment) protocol consisting of an initial battery of tests adapted from Rogers et al [28]. These tests consist of a series of tests for noninvasive, rapid, and quantitative assessment of autonomic, sensory, and motor integrity in mice using standard methods such as open field, jar view and grid tests to provide a behavioural and functional profile. All tests were performed in the same order for each mouse under appropriate behavioral testing conditions. Mice were evaluated between 4-6, 10-15, and 22-25 months of age. The exact age or period are indicated in the figure legends. Experiments were conducted by an observer who was blinded to the genotype of the mice.

Motor assessment: Mice motor performances were assessed using Rotarod (model 7650, Ugo Basile, Comerio, Italy). Each session consisted of three trials of 330 seconds with an acceleration period (4 to 40 rpm during 180 seconds) followed by 150 seconds at constant maximal speed. Results are the mean of 4 consecutive sessions performed after habituation. Muscle strength was determined using a gripmeter (ALG01; Bioseb, France). Mouse was placed over a metallic grid that it instinctively grab to try to stop the involuntary backward movement carried out by the manipulator until the pulling force overcomes their grip strength. After the animal loses its grip, the strength-meter scores the peak pull force. The muscle force (in mN) was measured three times per mouse. Results are the mean of three consecutive assays.

Behavioral assessment: Food consumption was follow over a 12 days period in individual cages. The amount of food eaten and the variation of consumption between two consecutive days were measured. Sucrose preference was tested on four months old male mice. Mice were housed in individual cages and habituated to the presence of two drinking bottles for two days. Following this acclimation, mice had the free choice of either drinking plain water (bottle 1) or a sucrose solution (bottle 2). Starting from 0.25% to 4% the concentration of sucrose solution was increased every two days in bottle 2. The positions of the two bottles was switched daily to reduce any confound produced by a side bias and water and sucrose solution intake were measured every two days. Sucrose preference was calculated as a percentage of the volume of sucrose intake over the total volume of fluid intake and

averaged over the testing period. Stereotypies were studied in home cage. Thirty minutes before recording, the home cage was placed in the area of recording and several pellets of regular food were placed on the ground in the cage. Mice were recorded for 15 minutes and behavior of each mouse was analyzed separately. Upright scrabbling was defined as a mouse rearing along a wall or in a corner and appearing to run or climb on place [29]. Crawl over corresponded to subject's forelimbs crossing the midline of the dorsal surface of the other mouse.

Electromyography

Electromyography recordings were made using a standard apparatus (Dantec, France) as previously described [30] [31]. Mice were anesthetized with a solution of ketamine/xylazine (100mg/kg-16mg/kg) injected intraperitoneally and kept on an heating pad to maintain a physiological muscle temperature (at about 31°C). A concentric needle electrode (no. 9013S0011, diameter 0.3 mm; Medtronic, Minneapolis, MN) was inserted in the selected muscle, and a monopolar needle electrode (no. 9013R0312, diameter 0.3 mm; Medtronic) was inserted into the tail of the mouse to ground the system. Electrical activity was monitored in both *gastrocnemius* and *tibialis anterior* on both legs for at least 2 min. Spontaneous activity was differentiated from voluntary activity by visual and auditory inspection. Only spontaneous activity with a peak-to-peak amplitude of at least 50 μ V was considered to be significant

Tissues preparation

For biochemistry, mice were killed by decapitation and tissues were carefully dissected and stored at -80C until used.

RNA extraction and RT-Real-time PCR

Total RNA was prepared following standard protocols. Briefly, each frozen sample was placed into a tube containing a 5-mm stainless steel bead. Working on ice, 1 mL Trizol reagent (Invitrogen, Groningen, The Netherlands) was added, and homogenization was performed in a TissueLyser (Qiagen, Valencia, CA) at 30 Hz for 3 min twice. RNA was extracted with chloroform/isopropyl alcohol/ethanol and stored at -80°C until use. One μ g of total RNA was used to synthesize cDNA using Iscript reverse transcriptase (BioRad Laboratories, Marnes La Coquette, France) and oligo-dT primer as specified by the manufacturer. Gene expression was measured using the SYBR green reagent (2 \times SYBR Green Supermix; Bio-Rad Laboratories) following the manufacturer's instructions on a Bio-

Rad iCycler. PCR was performed in optimized conditions: 95°C denatured for 3 min, followed by 40 cycles of 10 s at 95°C and 30 s at 60°C. Primer sequences are given in supplementary table1. Standardization was performed using three standard genes: 18S (18S Ribosomal RNA), Polr2 (Polr2 polymerase RNA 2 DNA directed polypeptide A) and Tbp (TATA-box binding protein) to compute a normalization factor using Genorm software v3.5.

Western Blot analysis:

Whole tissue protein extraction was performed as follows. Snap frozen muscle tissue was pulverized in a TissueLyser (Quiagen) 2x20sec under liquid nitrogen using stainless steel beads. Tissue powder was homogenized in RIPA lysis buffer (50mM Tris 7.4pH, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1% Triton 100X, 0.1% SDS, 0.5% Sodium Deoxycholate) 1ml/100mg tissue containing 1/100 protease inhibitor cocktail (Calbiochem), phosphatase inhibitor cocktail 2 and 3 (Sigma Aldrich). Protein quantification was carried out using a BCA Assay Reagent Kit (UP95424 Uptima). Equal amounts of soluble proteins were denatured by boiling, resolved by sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to a 2 μ m nitrocellulose membrane (BioRad) using a semi-dry Transblot Turbo transfer system (BioRad). After using a chemiluminescent blocker (Millipore, Billerica, MA, USA), membranes were probed with primary antibodies against HA (Cell Signalling, #3724s, 1/100) and CHMP2B (Abcam, #AB33174, 1/1000 and Proteintech #12527-1-AP, 1/1000), actine (Sigma #A2103, 1/1000) H3 histone (Cell Signalling, #9715s,1/1000) and secondary antibodies (P.A.R.I.S, anti-rabbit HRP # BI2407, anti-mouse HRP # BI2413C, 1/1000). The protein bands were detected by chemiluminescence using an ECL Lumina Forte (Millipore) and a chemiluminescence detector (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Histology:

Mice were anesthetized with 120mg/Kg ketamine, 16mg/Kg xylazine injected intraperitoneally and perfused with 4% ice-cold paraformaldehyde in 0.1M phosphate buffer pH7.4. Tissues were post-fixed in the same fixative for 24h and kept at 4°C in PBS containing 0.002% thimerosal until use.

Forty μ m thick sections of brain and spinal cord were performed using a Leica VT1000S vibratome. The following antibodies were used: anti-Choline Acetyl Transferase (ChAT, Chemicon, #ab144P, 1/100), anti-FUS (Bethyl, #A303-839A, 1/200), anti-GFAP (Cell Signalling, #36705, 1/200), anti-HA (Cell Signalling, #3724s, 1/100), anti-NeuN (Millipore, #ABN78, 1/100), anti-p62 (Abcam, #AB56416, 1/100), anti-TDP43 (Proteintech,

#107822AP, 1/100), anti-ubiquitine (Chemicon, #MAB1510, 1/200). For immunoperoxidase staining, free floating sections were pretreated 10 min in PBS-3% H_2O_2 followed by 30 min in PBS containing 1%triton-X100 and 5% donkey serum, and 30min at 80°C in citrate buffer pH6. Selected primary antibodies were incubated overnight at room temperature at the indicated concentration in PBS containing 0.1%triton-x100 (PBT). After 3 washes with PBT, sections were incubated one hour at room temperature with the appropriate biotinylated secondary antibody (biotinylated donkey anti-mouse IgG or biotinylated donkey anti-rabbit IgG, Jackson Immunoresearch) followed by 3 washes with PBT and one hour incubation with the ABC complex according to manufacturer's instructions (Vector Laboratories). Revelation was performed using the Vectastain ABC kit (Vector Laboratories). For fluorescent double immunolabelling, H_2O_2 pre-treatment was omitted and the secondary antibodies used were coupled with either Alexa488 or Alexa594.

To study the NMJ morphology, bundles of muscle fibers were prepared from the *tibialis anterior* muscle under a binocular microscope, and labeled with antibodies directed against synaptophysin (Millipore, #MAB5258, 1/100) and neurofilament 200 (Sigma, #N1442, 1/200), and rhodamine-conjugated alpha-bungarotoxin (aBGT 1 μ g/mL Sigma) and Hoechst 33342 (1 μ g/mL, Sigma) using a standard protocol. Usually, 5–6 bundles were examined per animal, which represented 30-60 analyzed NMJs per animal.

Sciatic nerves were dissected and stained by 1% osmium tetroxide, dehydrated, and embedded in Araldite. Semi-thin sections (1.5- μ m-thick) were performed using a Leica RM2265 microtome. The area of myelinated axons was measured using the LuciaG software. Between 90 and 95% of the fibers present in the section were analyzed for each sciatic nerve.

Motor neuron were counted in the ventral horns of the lumbar spinal cord segments L3–L5, using at least 7 non-adjacent cryosections 10- μ m thick per animal examined in a Nikon microscope at a 200 \times magnification [32]. Sections were stained with 1% toluidine blue in 5% sodium borate, and the cross-sectional areas of the stained cells were measured with the NIH Image software. Only those cells with an area $\geq 600 \mu m^2$ were considered as motor neurons. In a parallel set of sections, motor neurons were identified by immunostaining with an antibody directed against choline acetyltransferase as described above. Counts of ChAT positive motor neurons were performed by an independent genotype-blinded observer.

All pictures were taken with a Nikon Eclipse E800 microscope, a Nikon digital sight DS-U3 camera and the NIS Element software.

Statistical analysis

Unless otherwise indicated, data are expressed as the mean \pm SEM. GraphPad Prism version 6.0a software was used for statistical analysis. Tests are indicated in the legends under the figures. Differences with *P*-values of at least less than 0.05 were considered significant. For Kaplan-Meier survival analysis, a Log Rank test was used to determine significance.

RESULTS

Generation of a transgenic mouse line expressing the human CHMP2B^{intron5} mutant, expression profile and tissues distribution of the transgene.

The Tg mouse line was generated using a DNA fragment coding for the human CHMP2B^{intron5} mutant cDNA, a mutant identified in human familial FTD [20], tagged with two hemagglutinine (HA) sequences. The linearized vector containing the cDNA inserted in the Thy1.2 expression cassette (Fig.1A) was used for microinjection into one-cell embryos. Hundred and six live pups were analyzed by PCR for the presence of transgene, resulting in one male founder mouse. This founder was successfully mated to establish the Tg line CHMP2B^{intron5} and showed a stable transmission of the transgene at the expected Mendelian ratio. Hemizygous mice were interbred to obtain wild type (WT) hemizygous (HE) and homozygous (HO) mice in the same litters. As determined by quantitative PCR, genomic DNA of HE mice contained 6 copies (6.374 ± 0.366 , $n=5$) of the transgene per diploid cell and this amount was doubled with copies (12.91 ± 0.747 , $n=5$) in HO mice.

As shown by RT-PCR analysis (Fig. 1B), CHMP2B^{intron5} mutant mRNA was specifically expressed in the brain and the spinal cord and to a lesser extent in the lung and the thymus of HE mice. However, CHMP2B^{intron5} mRNA was not detectable in the liver or the skeletal muscle, in accordance with the Thy1.2 expression pattern described by Caroni (1997). In the brain, the mRNA level of the CHMP2B^{intron5} mutant was six times higher to the level of endogenous CHMP2B mRNA (figure 1C) in HE mice, and 12 times higher in HO mice.

This expression profile was confirmed by western blot analysis using an antibody directed against the HA-tag. CHMP2B^{intron5} mutant protein was specifically expressed in

neuronal tissues but not in liver or in skeletal muscle of Tg mice (Fig. 1D) while endogenous mouse CHMP2B was expressed in neuronal tissues of WT and Tg mice.

We further investigated the distribution of CHMP2B^{intron5} in the brain and spinal cord by immunohistochemistry using an antibody directed against HA (Figure 2). HA immunoreactivity is detectable in all the region of the brain (table 1) with a high level of expression in the cortex, the amygdala, the pallidum, the thalamus and the medulla.

In the spinal cord, the large cells of the ventral horn corresponding to motorneurons (MNs) were strongly labeled compared to other neurons in the cord. To confirm the neuronal expression of the transgene, with performed a double staining for HA and NeuN a neuronal marker (figure 3). In all regions of the brain and spinal cord studied, the HA positive cells corresponding to the CHMP2^{intron5} expressing cells were systematically positive to NeuN. However, some neurons were negative to HA suggesting a lower level or an absence of expression of the transgene in these neurons.

Overexpression of human CHMP2B^{intron5} causes progressive motor impairments and death in mice.

Weight, general health and motor functions were assessed on a monthly basis from 1 month of age. Kaplan-Meyer survival analysis revealed that HE and HO mice had significant reduced survival when compared with their WT littermates with a mean survival of 651, 166 and 795 days respectively (Figure 4A). Until one month of age, Tg mice were indistinguishable from their Wt littermates when observed by visual inspection. From 1 month of age, HO mice failed to gain weight normally while the growth of HE mice was comparable to those of WT littermates until 17 months of age (Fig. 4B). As shown in table 2, except for the weight, all the parameters studied to characterize the general health in the SHIRPA protocol were comparable between WT and Tg mice. However, this analysis pointed out alterations in motor functions and behaviour of Tg mice.

Progressively HO mice began to develop motor dysfunctions and gait alterations (figure 4). They became unable to extend their hindlimb when hold by the tail as early as 4 months of age whereas the control mice extended their limbs. They showed a 60%, 49% and 60% decrease in footstep length, width and diagonal respectively when compared to size-matched mice (figure 4 C,E). They also exhibited an exaggerated spacing of the in hindlimb feet position relative to the body axis when compared to size-matched WT littermates (figure

4F). These changes were associated with the development of tremors and twitches (figure 4G and table 2). At three months of age, HO mice presented with a significant 2/3 reduction of their motor capacities when tested on the accelerating rotarod, compared to Wt and HE littermates (figure 4J). At the same age, their muscle strength was decreased by 25% when compared to WT and HE mice (figure 4I). Between 4 to 6 months, 70% of the HO mice presented with an altered righting reflex when they were placed on their back (figure 4H).

With time, they displayed signs of progressive hind limb paralysis associated with a severely stilted gait. They were euthanized when paralysis prevented them to roll over within 10 s after being placed on their back.

In contrast, HE animals gained weight normally and displayed no significant motor dysfunction or signs of illness until 10 months of age. From this age, HE mice progressively developed tremors and twitches (figure 4G and table 2), showed a progressive reduction of their capacity to stay on the rotarod (figure 4J), and loose weight from 17 months of age (figure 4B). Their muscle strength was significantly reduced from 18 months (figure 4I). Paralysis occurred around 22 months and their lifespan is slightly shorter than their WT littermates.

Altogether, these results showed a progressive and dose dependent effect of CHMP2^{intron5} expression on motor functions reminiscent with ALS and parkinsonism.

Overexpression of CHMP2B^{intron5} results in impaired neuromuscular function and distal axonopathy.

Progressive paralysis observed in ALS results from progressive denervation of skeletal muscles [33]. To identify the origin of motor impairments described above, we then focused on the motor units composed of the motor neurons, their axons and the associated skeletal muscles. Using the EMG techniques we first looked for the presence of abnormal electrical activity in skeletal muscle of anesthetized mice. Recording of the resting activity in the gastrocnemius muscle consistently revealed abnormal spontaneous activity with fibrillation potentials of HO and HE mice at late stages of the disease, when paralysis occurred (Fig. 5A). Numerous fasciculations were also observed. We then measured the expression of two molecular markers of denervation in the muscle, the alpha sub-unit of the acetylcholine receptor (AChRa) and the myogenin (myog) that are both induced following denervation. As shown by RT-qPCR analysis (Fig. 5B), in HO mice, mRNA levels of AChRa and myogenin were respectively induced by 2- and 3-folds at 6 month and 2- and 5-folds at 12 months

compared to WT littermates. We then further assessed the innervation state of the NMJ. To this end, the presynaptic terminals were identified on muscle bundles using an anti-synaptophysin antibody, and AChRs were labeled by fluorescent α -BGT-binding. Figure 5C represents typical photographs obtained after confocal analysis. We found that the number of denervated or partially innervated NMJs was higher in HO and HE mice than in WT littermates (Fig. 5D). In addition, the morphology of the post-synaptic AchR clusters was also altered (Fig. 5E). Post-synaptic AchR clusters lose their classical bretzel-like shape and became less complex and more fragmented. However, their surface was comparable to WT littermates (not shown). In parallel the number of large myelinated axons ($>20\mu\text{m}$) in the sciatic nerve was decreased while the number of small caliber myelinated axons ($\leq 5\mu\text{m}$) was increased (Fig. 6A,B). While spinal cord motoneuron degeneration is a hallmark of ALS and has been shown in mouse models of ALS, [34] [35] [36] we wondered whether the motor phenotype observed was due to motoneuron degeneration. MNs were counted in the ventral horns of lumbar spinal cords from 12 and 24 months old mice. As shown on the typical photographs figure 6C and with the quantification (Fig. 6D), the number of MNs in ventral horn of the spinal cord was comparable between the three genotypes and the decreased in number of MN with age was the same.

Astrocytosis is a hallmark of neuronal damages and occurs in the brain and spinal cord of ALS patients [37] [38], ALS-FTD patients [39] and in a SOD1 mouse ALS model [35]. We performed immunostaining of the astrocyte marker Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) and revealed a higher density of astrocytes at 6 months, in HE and HO mice in the cortex, the brain stem and the spinal cord. We confirmed and quantified this phenomenon by qPCR quantification of GFAP mRNA in the brain and showed a 3-folds increase of GFAP expression in HO mice.

Altogether these results indicate a distal alteration of the neuronal function, with partial muscle denervation without motoneuron degeneration.

CHMP2B^{intron5} mice develop behavioral alterations.

To investigate whether the CHMP2B^{intron5} mice developed behavioral changes related to FTD we performed a series of tests aimed at modeling the most representative symptoms of FTD in mice. Changes in food consumption and /or preference are frequently seen in FTD patients and they often develop a preference for sweetened food or drink. To test whether Tg mice

developed altered preference to sweetened drink, we measured the sucrose preference in mice by using the two bottles paradigm (Fig. 8A). We observed that for all tested sucrose concentrations, HE and WT showed a comparable preference for the sucrose solution. Until 2% sucrose concentration in drinking water, HO mice behaved like their littermates. However, when tested with a 4% sucrose solution HO mice exhibited a lower preference for the soft drink than the WT and HE mice. We then measured the daily food intake of the mice. HO mice eat more (Fig. 8B) and spent more time visiting food pellets (Fig. 8C) than WT and HE mice. Stereotypic behaviors are commonly described in FTD patients and appear early in the course of the disease. In their homecage, at 4 months of age, almost all HO mice presented with stereotyped behavior, whereas this was rare for HE and WT mice. Upright scrabbling (Fig. 8D), repetitive burying or relentless chewing of a piece of food were observed in HO mice. We further quantified two types of social interaction (nose contact and crawl over) and saw a tendency toward less social interaction of HO mice with their cage mates (Fig. 8E,F). The exploration behavior of the mice was evaluated in an open field arena. As shown in figure 8G, all genotypes had the same level of locomotion. However HO mice had atypical patterns of exploration characterized by the frequent changes in direction (Fig. 8H), mirroring the restlessness and lack of concentration observed in FTD patients.

CHMP2B^{intron5} mice neurons contain protein inclusions.

Protein aggregates are a common denominator of ALS and FTD. Figure 9 and 10 show that neurons and MNs of HO mice presented with cytoplasmic inclusions of p62, an ubiquitin associated protein present in inclusions in the brain of patients, of ubiquitin and inclusions of the mutant CHMP2B protein. As neuronal TDP-43 aggregation often occurs in ALS and FTD patient, we looked for the presence of such inclusions in the brain of the CHMP2B^{intron5} mice and showed a normal nuclear localization of TDP-43 (supplementary data).

DISCUSSION

Previously, in 2012, Ghazi-Noori [18] reported a transgenic line expressing the CHMP2B^{intron5} mutation driven by the hamster prion promoter. However, according to the published data, this line only developed cellular modifications without any evident clinical signs.

In this study, we reported the generation and the detailed characterization of the first transgenic mouse line expressing the CHMP2B^{intron5} mutant in neurons, especially in the cortex and the spinal cord, which developed clinical and histopathological hallmarks of both ALS and FTD.

In 2005, the mutation leading to the production of CHMP2B^{intron5} was described by Skibinsky et al. [20] in a large Danish family with FTD linked to chromosome 3 (FTD3). Interestingly, the c-terminal region deleted with this mutation also contained point mutation sites found in ALS [10] [21] and FTD [20] [25] patients, suggesting a common contribution of this region in both pathologies. To test this hypothesis, we generated a new transgenic line expressing this mutant.

Because CHMP2B is mainly expressed in neurons, especially in the frontal and temporal lobes of the cortex, the hippocampus, and the cerebellum [20], we selected the mouse thy1.2 promoter to drive the expression of our CHMP2B^{intron5} construct. This promoter has been used before to over-express other proteins in mice and is known to be highly active in the neuronal populations that normally express CHMP2B [26][40].

Despite the large number of microinjected eggs, we only obtained one founder. However difficulties in producing constitutively expressing transgenic animals appear to be a feature of both CHMP2B^{intron5} and WT CHMP2B models. Indeed, Ghazi-Noori and collaborators [18] obtained only two lines of mice for each construct using the hamster prion promoter, a promoter which drives strong expression in neurons in the hippocampus, Purkinje cells and a few other neuronal cell types, to drive the expression of their constructs. Interestingly the same difficulties were encountered for other genes involved in MND or FTD such as TDP43 or Fus [41] [42] [43] suggesting a potential early toxicity of genes related to neurodegenerative process during development irrespective of the promoter used.

In our mice, the murine Thy1.2 promoter directed expression of CHMP2B^{intron5} to many neuronal types but clearly not in other cell types. Brain regions, which in human disease are spared from FTD pathology, such as the cerebellum the hypothalamus or the striatum, did not express detectable levels of transgene, as determined by immunoperoxidase. At the mRNA level CHMP2B^{intron5} was increased in comparison with those of the endogenous mouse CHMP2B in brain extracts. However, in FTD 3 patients, the mRNA levels of CHMP2B^{intron5} were only expressed at 40% of the wild type CHMP2B levels [17]. However, at the protein levels, the immunohistochemical detection of the transgene clearly showed a heterogeneity of labelling amongst neuronal populations, a variability which could also exist

in patients. Such variability in the expression level suggests potential different effects on neuronal populations according to the cell-specific expression level of CHMP2B^{intron5}.

In patients, CHMP2B mutation carriers typically present with behavioral variant of FTD characterized by stereotyped or repetitive behaviors, hyperorality, hyperactivity or impulsivity, apathy and impaired social interactions. These changes in behavior can be accompanied by motor symptoms related to ALS and associated with parkinsonism features such as gait impairment, rigidity or tremors [44]. In the case of CHMP2B^{intron5}, in contrast to the line obtained by Ghazi-Noori [18], its overexpression driven by the Thy1.2 promoter has resulted in several molecular, cellular, and phenotypic changes in the mice. These changes include behavioral changes, progressive loss of motor neuron function, increase of gliosis, and notably, p62-ubiquitine-associated proteinopathological features. These changes are strikingly similar to the neurological and pathological features of the bvFTD patients.

The CHMP2B^{intron5} mice displayed age-dependent and dose-dependent changes in their behavior. They progressively developed stereotypies, changes in food preferences, increased food consumption and decreased social interactions. With age, signs of apathy (delayed visual placing, decreased provoked biting) were also observed. All these changes correspond to the clinical symptoms developed by the FTD patients.

Further, these Tg mice displayed an age-dependent and dose-dependent loss of the motor functions. As early as three month of age, HO mice exhibited gait abnormalities, impairment of hindlimb placement and extension, and tremors reminiscent of ataxia and parkinsonism. Their motor coordination and their muscle strength were also progressively altered. The progressive muscle weakness and paralysis in our mice mirrored motor symptoms of ALS patients. However, the motor phenotype in the CHMP2B^{intron5} mice was not associated with spinal MNs loss. In addition, the denervation was mild, and detectable by EMG only at the late stage of the pathology. Although spinal MNs loss is considered as a cardinal feature of ALS in patients and in mutant SOD1-based ALS mouse models, several studies indicated that it is the dysfunction rather than the death of MNs that triggers the muscle denervation. Indeed, in these models as in patients, NMJ dismantlement is one of the first pathologic events in the course of the disease [33] [45]. Moreover, protecting MN cell body from the death by pharmacological or genetic approaches is not sufficient to prevent the denervation process and the progression of the disease [46] [47]. In our model we showed molecular and cellular clues indicative of an alteration of the NMJs. Indeed, the induction of

AChRa and myogenin observed are characteristics of muscle denervation. Moreover, at the end stage, when EMG recordings exhibit spontaneous activity of denervation, 70% of the NMJs presented with a partial retraction of the nerve terminals. It is noticeable that a neuron specific expression of SOD1 mutant in mice induced the same motor phenotype without significant MNs degeneration [48] [49] [50] in contrast to the SOD1 models where the mutants are expressed ubiquitously [36] [35]. Interestingly, these mice also developed an astrocytosis in brain and spinal cord that progressed with time as described respectively for ALS and FTD, and ALS patients.

Several mechanisms could support the distal degeneration of motoneurons and the behavioral impairments observed in the CHMP2B^{intron5} mice. CHMP2B is involved in several cellular processes related to protein clearance and membrane remodelling. In 2007 Lee et al [16] demonstrated that, *in vitro*, CHMP2B^{intron5} impaired autophagy leading to the accumulation of autophagosomes. In addition, expression of CHMP2B^{intron5} in cultured hippocampal neurons impaired dendritic spines formation and synaptic plasticity [19]. Finally, *in vivo*, neuronal expression of CHMP2B^{intron5} in mice led to protein aggregation and cytoplasmic inclusions [18] and our results, which could impair the axonal transport as already shown in the ALS mice models [51] [52] [53]. With time, the accumulation of these aggregates might become progressively toxic for the neurons and induce their degeneration. All these mechanisms are relevant in the context of ALS and FTD and could account for the development of the pathology.

Finally, our CHMP2B^{intron5} mice developed histopathological hallmarks of FTD3 characterized by the presence of cytoplasmic aggregates in the neurons. These ubiquitine and p62 positive, and TDP43 and Fus negative inclusions are comparable to those found in FTD3 patients whereas the majority of FTD patients present a histopathology with aggregates containing TDP-43, Fus or Tau.

In conclusion, we showed that a human FTD3 linked mutant, the CHMP2B^{intron5} specifically expressed in neurons can trigger ALS and FTD-like symptoms and characteristic histopathological hallmark in mice. In addition, the phenotype observed is milder in HE mice than in HO mice showing a dosage effect. To date, the cellular and molecular mechanisms leading to this phenotype remain to be elucidated. This unique transgenic line will now allow studying the mechanistic continuum and the pathological processes shared by ALS and FTD. Understanding the way a CHMP2B mutation lead to neurodegeneration might open new avenues for the discovery of therapeutic targets for these two diseases with currently no cure.

BIBLIOGRAPHY

1. Ratnavalli, E., et al., *The prevalence of frontotemporal dementia*. Neurology, 2002. **58**(11): p. 1615-21.
2. Strong, M.J., et al., *Cognitive impairment, frontotemporal dementia, and the motor neuron diseases*. Ann Neurol, 2003. **54 Suppl 5**: p. S20-3.
3. Fecto, F. and T. Siddique, *What is repeated in ALS and FTL D*. Lancet Neurol. **11**(1): p. 25-7.
4. Strong, M. and J. Rosenfeld, *Amyotrophic lateral sclerosis: a review of current concepts*. Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord, 2003. **4**(3): p. 136-43.
5. Murphy, J.M., et al., *Continuum of frontal lobe impairment in amyotrophic lateral sclerosis*. Arch Neurol, 2007. **64**(4): p. 530-4.
6. Phukan, J., et al., *The syndrome of cognitive impairment in amyotrophic lateral sclerosis: a population-based study*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2011. **83**(1): p. 102-8.
7. Bak, T.H. and J.R. Hodges, *Motor neurone disease, dementia and aphasia: coincidence, co-occurrence or continuum?* J Neurol, 2001. **248**(4): p. 260-70.
8. Lomen-Hoerth, C., T. Anderson, and B. Miller, *The overlap of amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia*. Neurology, 2002. **59**(7): p. 1077-9.
9. Ling, S.C., M. Polymenidou, and D.W. Cleveland, *Converging mechanisms in ALS and FTD: disrupted RNA and protein homeostasis*. Neuron. **79**(3): p. 416-38.
10. Parkinson, N., et al., *ALS phenotypes with mutations in CHMP2B (charged multivesicular body protein 2B)*. Neurology, 2006. **67**(6): p. 1074-7.
11. Gitcho, M.A., et al., *TARDBP 3'-UTR variant in autopsy-confirmed frontotemporal lobar degeneration with TDP-43 proteinopathy*. Acta Neuropathol, 2009. **118**(5): p. 633-45.
12. Vance, C., et al., *Mutations in FUS, an RNA processing protein, cause familial amyotrophic lateral sclerosis type 6*. Science, 2009. **323**(5918): p. 1208-11.
13. Johnson, J.O., et al., *Exome sequencing reveals VCP mutations as a cause of familial ALS*. Neuron. **68**(5): p. 857-64.
14. DeJesus-Hernandez, M., et al., *Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS*. Neuron. **72**(2): p. 245-56.
15. Renton, A.E., et al., *A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD*. Neuron. **72**(2): p. 257-68.
16. Lee, J.A., et al., *ESCRT-III dysfunction causes autophagosome accumulation and neurodegeneration*. Curr Biol, 2007. **17**(18): p. 1561-7.
17. Urwin, H., et al., *Disruption of endocytic trafficking in frontotemporal dementia with CHMP2B mutations*. Hum Mol Genet. **19**(11): p. 2228-38.
18. Ghazi-Noori, S., et al., *Progressive neuronal inclusion formation and axonal degeneration in CHMP2B mutant transgenic mice*. Brain. **135**(Pt 3): p. 819-32.
19. Belly, A., et al., *CHMP2B mutants linked to frontotemporal dementia impair maturation of dendritic spines*. J Cell Sci. **123**(Pt 17): p. 2943-54.
20. Skibinski, G., et al., *Mutations in the endosomal ESCRTIII-complex subunit CHMP2B in frontotemporal dementia*. Nat Genet, 2005. **37**(8): p. 806-8.
21. Cox, L.E., et al., *Mutations in CHMP2B in lower motor neuron predominant amyotrophic lateral sclerosis (ALS)*. PLoS One. **5**(3): p. e9872.
22. van Blitterswijk, M., et al., *Genetic overlap between apparently sporadic motor neuron diseases*. PLoS One. **7**(11): p. e48983.
23. Rizzo, P., et al., *CHMP2B mutations are not a cause of dementia in Dutch patients with familial and sporadic frontotemporal dementia*. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet, 2006. **141B**(8): p. 944-6.
24. van der Zee, J., et al., *CHMP2B C-truncating mutations in frontotemporal lobar degeneration are associated with an aberrant endosomal phenotype in vitro*. Hum Mol Genet, 2008. **17**(2): p. 313-22.
25. Ghanim, M., et al., *CHMP2B mutations are rare in French families with frontotemporal lobar degeneration*. J Neurol. **257**(12): p. 2032-6.
26. Caroni, P., *Overexpression of growth-associated proteins in the neurons of adult transgenic mice*. J Neurosci Methods, 1997. **71**(1): p. 3-9.
27. Joshi, M., et al., *Real-time PCR to determine transgene copy number and to quantitate the biolocalization of adoptively transferred cells from EGFP-transgenic mice*. Biotechniques, 2008. **45**(3): p. 247-58.

28. Rogers, D.C., et al., *Behavioral and functional analysis of mouse phenotype: SHIRPA, a proposed protocol for comprehensive phenotype assessment*. Mamm Genome, 1997. **8**(10): p. 711-3.
29. Ryan, B.C., et al., *Social deficits, stereotypy and early emergence of repetitive behavior in the C58/J inbred mouse strain*. Behav Brain Res. **208**(1): p. 178-88.
30. Echaniz-Laguna, A., et al., *Electrophysiological studies in a mouse model of Schwartz-Jampel syndrome demonstrate muscle fiber hyperactivity of peripheral nerve origin*. Muscle Nerve, 2009. **40**(1): p. 55-61.
31. Dupuis, L., et al., *Mice with a mutation in the dynein heavy chain 1 gene display sensory neuropathy but lack motor neuron disease*. Exp Neurol, 2009. **215**(1): p. 146-52.
32. Dupuis, L., et al., *Evidence for defective energy homeostasis in amyotrophic lateral sclerosis: benefit of a high-energy diet in a transgenic mouse model*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(30): p. 11159-64.
33. Bjornskov, E.K., F.H. Norris, Jr., and J. Mower-Kuby, *Quantitative axon terminal and end-plate morphology in amyotrophic lateral sclerosis*. Arch Neurol, 1984. **41**(5): p. 527-30.
34. Ripps, M.E., et al., *Transgenic mice expressing an altered murine superoxide dismutase gene provide an animal model of amyotrophic lateral sclerosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(3): p. 689-93.
35. Morrison, B.M., et al., *Time course of neuropathology in the spinal cord of G86R superoxide dismutase transgenic mice*. J Comp Neurol, 1998. **391**(1): p. 64-77.
36. Gurney, M.E., et al., *Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation*. Science, 1994. **264**(5166): p. 1772-5.
37. Schiffer, D., et al., *Reactive astrogliosis of the spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis*. J Neurol Sci, 1996. **139 Suppl**: p. 27-33.
38. Murayama, S., et al., *A unique pattern of astrogliosis in the primary motor area in amyotrophic lateral sclerosis*. Acta Neuropathol, 1991. **82**(6): p. 456-61.
39. Niizato, K., et al., *Pick's disease with amyotrophic lateral sclerosis (ALS): report of two autopsy cases and literature review*. J Neurol Sci, 1997. **148**(1): p. 107-12.
40. Gordon, J.W., et al., *Regulation of Thy-1 gene expression in transgenic mice*. Cell, 1987. **50**(3): p. 445-52.
41. Wegorzewska, I., et al., *TDP-43 mutant transgenic mice develop features of ALS and frontotemporal lobar degeneration*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(44): p. 18809-14.
42. Tsai, K.J., et al., *Elevated expression of TDP-43 in the forebrain of mice is sufficient to cause neurological and pathological phenotypes mimicking FTLN-U*. J Exp Med. **207**(8): p. 1661-73.
43. Mitchell, J.C., et al., *Overexpression of human wild-type FUS causes progressive motor neuron degeneration in an age- and dose-dependent fashion*. Acta Neuropathol. **125**(2): p. 273-88.
44. Siuda, J., S. Fujioka, and Z.K. Wszolek, *Parkinsonian syndrome in familial frontotemporal dementia*. Parkinsonism Relat Disord. **20**(9): p. 957-64.
45. Fischer, L.R., et al., *Amyotrophic lateral sclerosis is a distal axonopathy: evidence in mice and man*. Exp Neurol, 2004. **185**(2): p. 232-40.
46. Rouaux, C., et al., *Sodium valproate exerts neuroprotective effects in vivo through CREB-binding protein-dependent mechanisms but does not improve survival in an amyotrophic lateral sclerosis mouse model*. J Neurosci, 2007. **27**(21): p. 5535-45.
47. Gould, T.W., et al., *Complete dissociation of motor neuron death from motor dysfunction by Bax deletion in a mouse model of ALS*. J Neurosci, 2006. **26**(34): p. 8774-86.
48. Jaarsma, D., et al., *Neuron-specific expression of mutant superoxide dismutase is sufficient to induce amyotrophic lateral sclerosis in transgenic mice*. J Neurosci, 2008. **28**(9): p. 2075-88.
49. Lino, M.M., C. Schneider, and P. Caroni, *Accumulation of SOD1 mutants in postnatal motoneurons does not cause motoneuron pathology or motoneuron disease*. J Neurosci, 2002. **22**(12): p. 4825-32.
50. Pramatarova, A., et al., *Neuron-specific expression of mutant superoxide dismutase 1 in transgenic mice does not lead to motor impairment*. J Neurosci, 2001. **21**(10): p. 3369-74.
51. Bilsland, L.G., et al., *Deficits in axonal transport precede ALS symptoms in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A. **107**(47): p. 20523-8.
52. De Vos, K.J., et al., *Familial amyotrophic lateral sclerosis-linked SOD1 mutants perturb fast axonal transport to reduce axonal mitochondria content*. Hum Mol Genet, 2007. **16**(22): p. 2720-8.
53. Gonzalez de Aguilar, J.L., et al., *Amyotrophic lateral sclerosis: all roads lead to Rome*. J Neurochem, 2007. **101**(5): p. 1153-60.

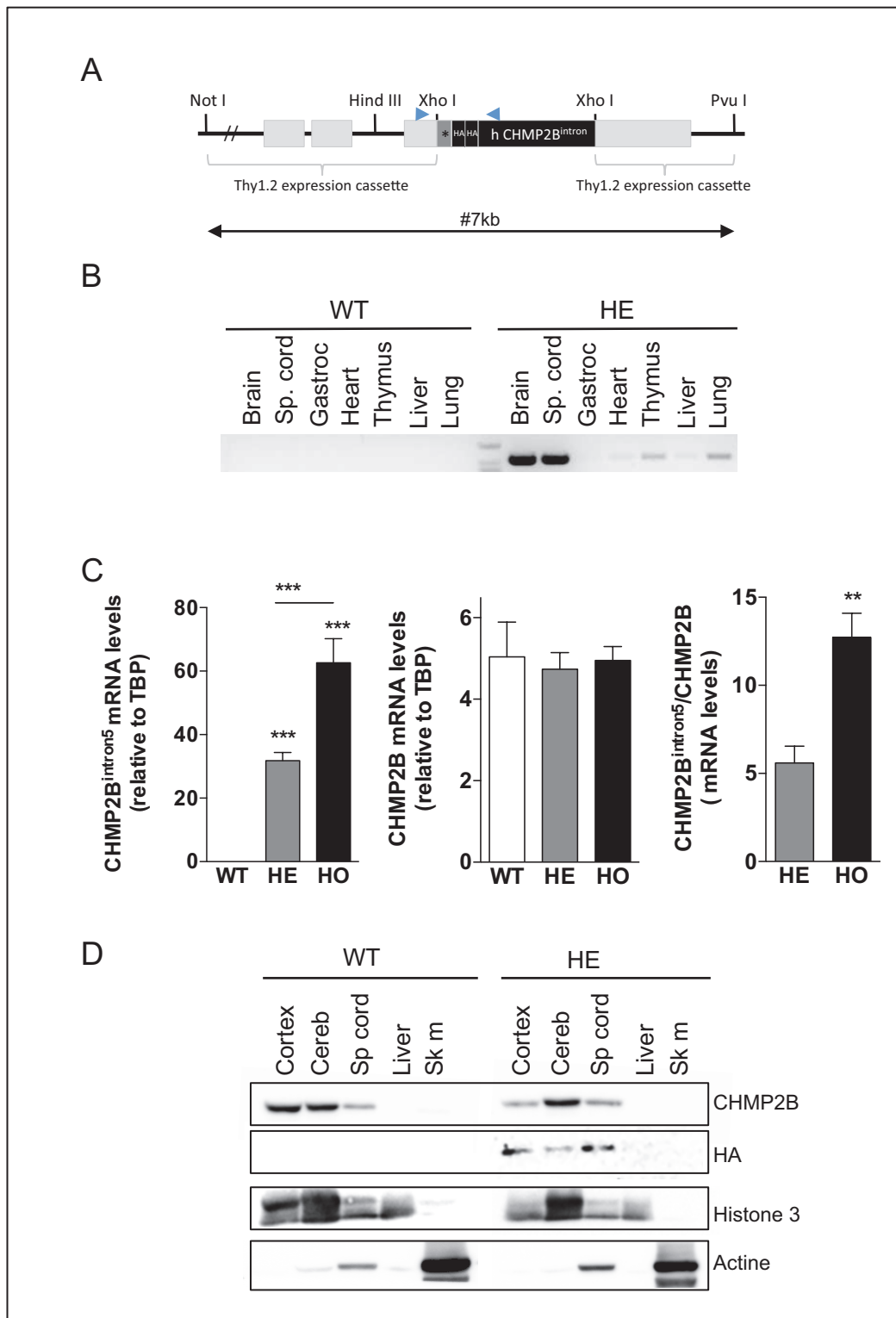


Figure 1: Characteristics of CHMP2B^{intron5} transgene expression.

A: Schematic representation of the sequence used to generate the CHMP2B^{intron5} mouse line. The human CHMP2B^{intron5} cDNA with an N-terminal dimeric HA tag sequence [19] was subcloned in the mouse Thy1.2 expression cassette [26] in frame with a Kozak sequence (*). Blue arrowheads show the position of the primers used for genotyping.

B: Transgene mRNA levels were measured in different tissues by semi-quantitative RT-PCR. CHMP2B^{intron5} mRNA were only detected in HE mice with high expression levels in the central nervous system.

C: Relative mRNA levels of endogenous CHMP2B and transgene CHMP2B^{intron5} were measured by RT-qPCR in brain extracts. Values represent the means±SEM, n=5/genotype, **p< 0.001, ***p<0.0001, one-way ANOVA followed by uncorrected Fisher's LSD.

D: CHMP2B and transgene CHMP2B^{intron5} protein levels detected by western blot. Note the specific HA staining corresponding to the transgene in the nervous tissue of the HE mice.

HE: hemizygous, HO: homozygous, Cereb: cerebellum, Sk m: skeletal muscle, Sp.cord: spinal cord.

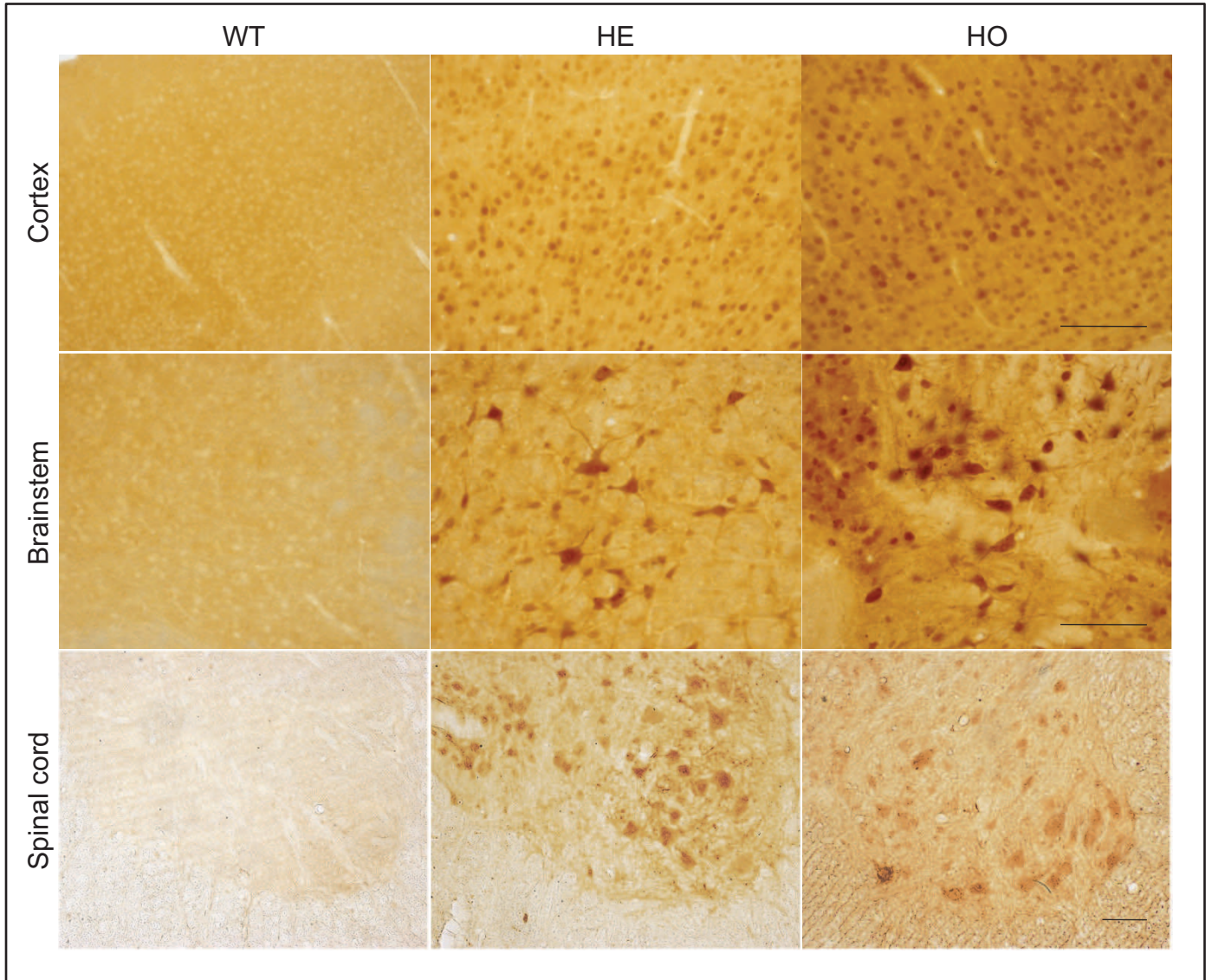


Figure 2: HA immunostaining in the central nervous system of $CHMP2B^{intron5}$ mouse line. The labelling is specifically found in the brain and spinal cord of hemizygous (HE) and homozygous (HO) mice of 6 months of age. Scale bar: 50 μ m

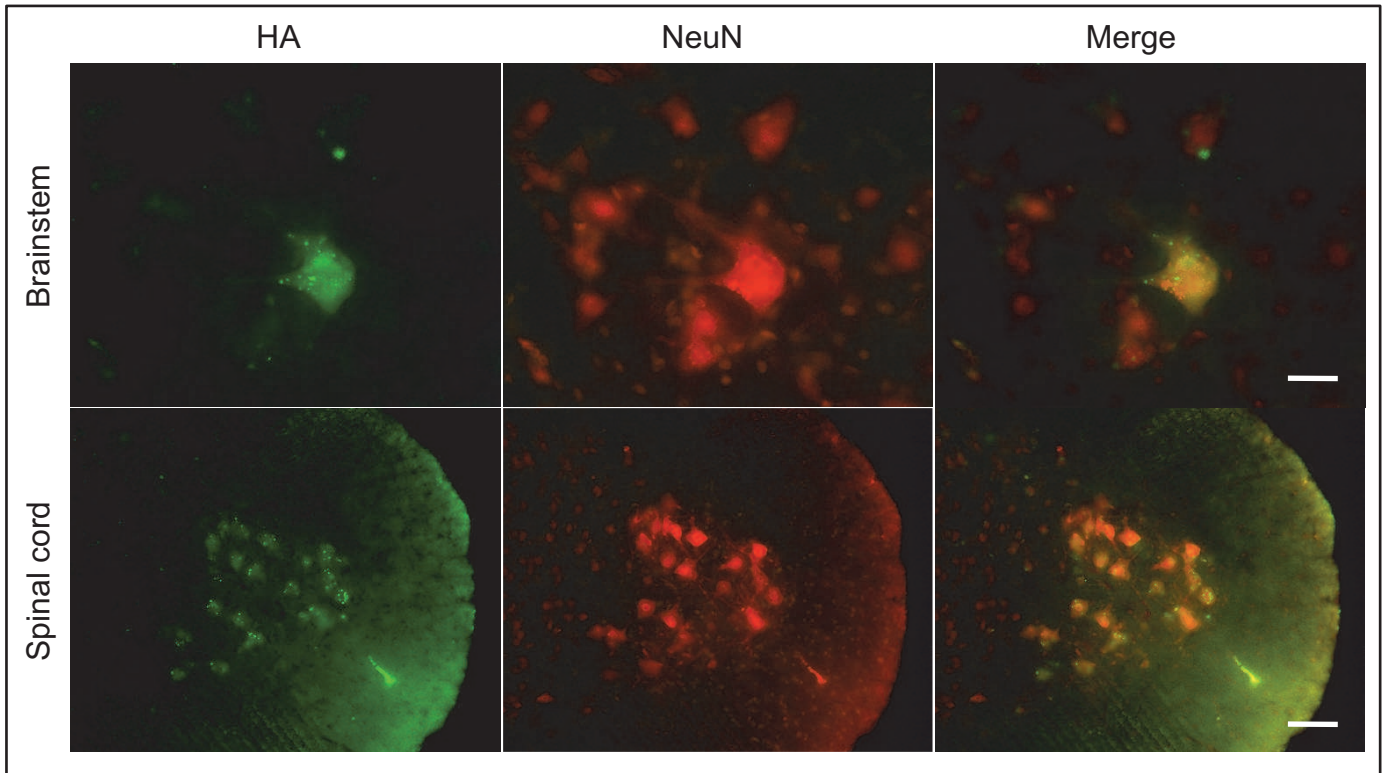


Figure 3: CHMP2B^{intron5} is expressed in neurons. Double immunolabelling of CHMP2B^{intron5} detected with an antibody against HA (green) and neurons detected with an antibody against NeuN (red). HA positive cells are also immunoreactive for NeuN showing a specific expression of the transgene in neurons. Note the presence of HA aggregates in neurons. Scale bar: brainstem: 25µm; spinal cord: 50µm.

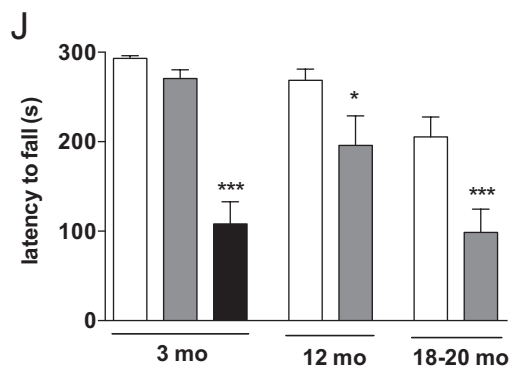
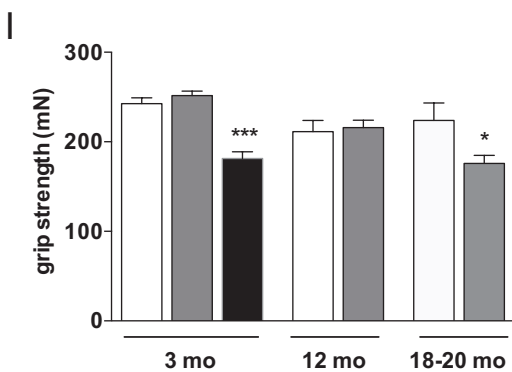
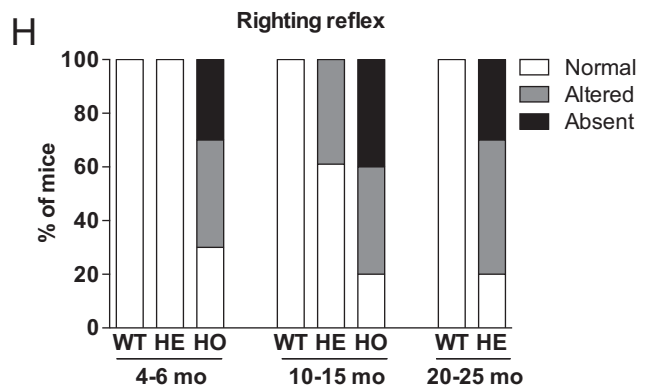
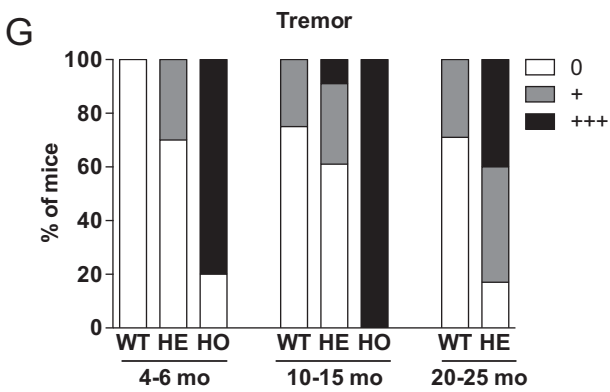
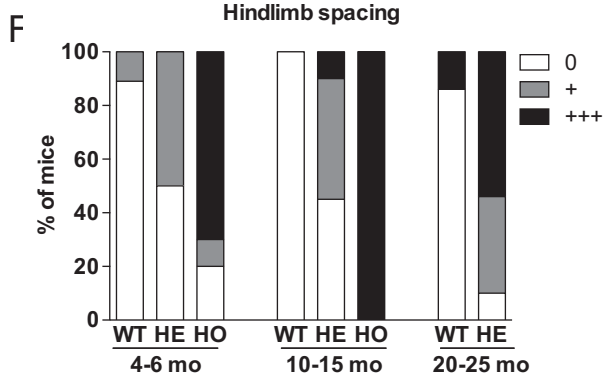
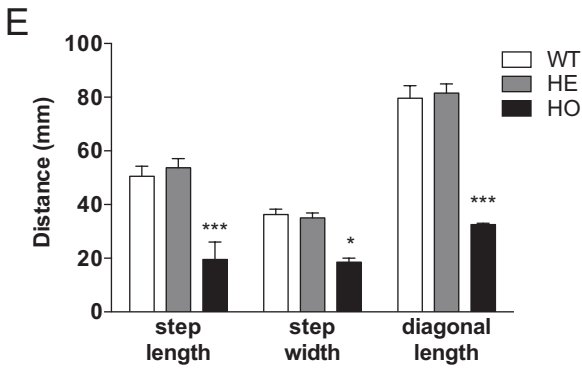
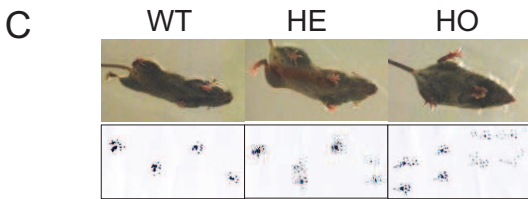
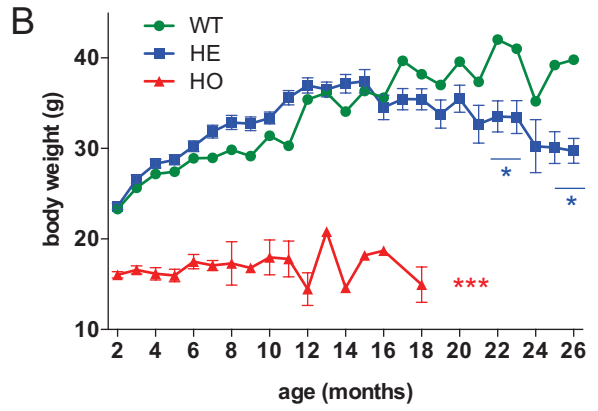
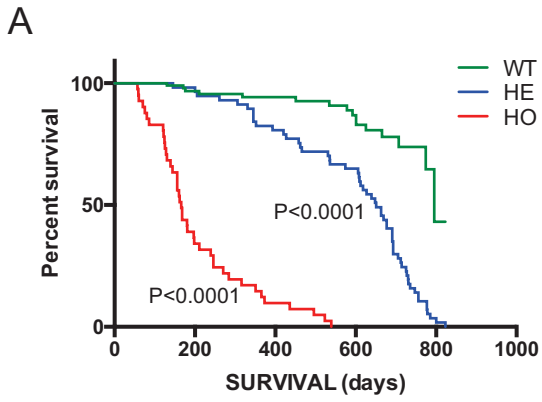


Figure 4: Over-expression of CHMP2B^{intron5} in neurons results in age- and dose-dependent motor dysfunctions and premature death.

A: Survival curve showing a median survival of 166, 651 and 795 days for HO, HE and WT. HO and HE survival significantly differs from WT. Log-rank Mantel-Cox test WT: n=123, HE: n=66, HO: n=41.

B: HO mice (red triangle) show failure to gain weight from 4 weeks of age and are significantly lighter than their WT (green circles) and HE (blue square) littermates. HE start to significantly loose weight from 16 months of age compared to the WT littermates. Values represent the mean±SEM, n= 123-5. *p<0.05, ***p<0.0001, multiple t test.

C: Representative foot print of 3 months old mice showing an altered stance and foot placement of HO mice.

D: Representative example of hind limb splay of a 3 months old HO mouse (right animal) compared to WT littermate (left animal).

E: Quantitative foot print analysis showing a significant decrease in all parameters measured for HO mice when compared to HE or WT size matched mice. WT: n =9, HE: n=6, HO: n:3. ***p<0.0001, *p<0.05, one way ANOVA followed by uncorrected Fisher's LSD.

F-H: Analysis of hindlimb spacing (F), Tremor (G) and righting reflex (H) at three stages. Results are expressed as the percentage of mice displaying the studied parameter in the population. HO mice present with increased hindlimb foot spacing, tremor and decrease of righting reflex as early at 4-6 month, these changes being more pronounced at 10-15 months. In HE mice these changes appear more progressively. WT: n =9, HE: n=6, HO: n:3

I: Grip test analysis showing an age-dependent and transgene copy number-dependent decrease of grip strength. Values represent the mean±SEM, WT: n=20; 11; 4, HE: n=27; 22; 9, HO: n=9. ***p<0.0001; *p<0.05, one-way ANOVA followed by uncorrected Fisher's LSD.

J: Rotarod test showing an age-dependent and transgene copy number-dependent impairment in performance on the rotarod starting from 3 months of age for HO mice and 12 months of age for HE mice. Values represent the mean±SEM, WT: n=9; 5; 7, HE: n=13; 5; 5, HO: n=5. ***p<0.0001; *p<0.05, one-way ANOVA followed by uncorrected Fisher's LSD.

Figure 5

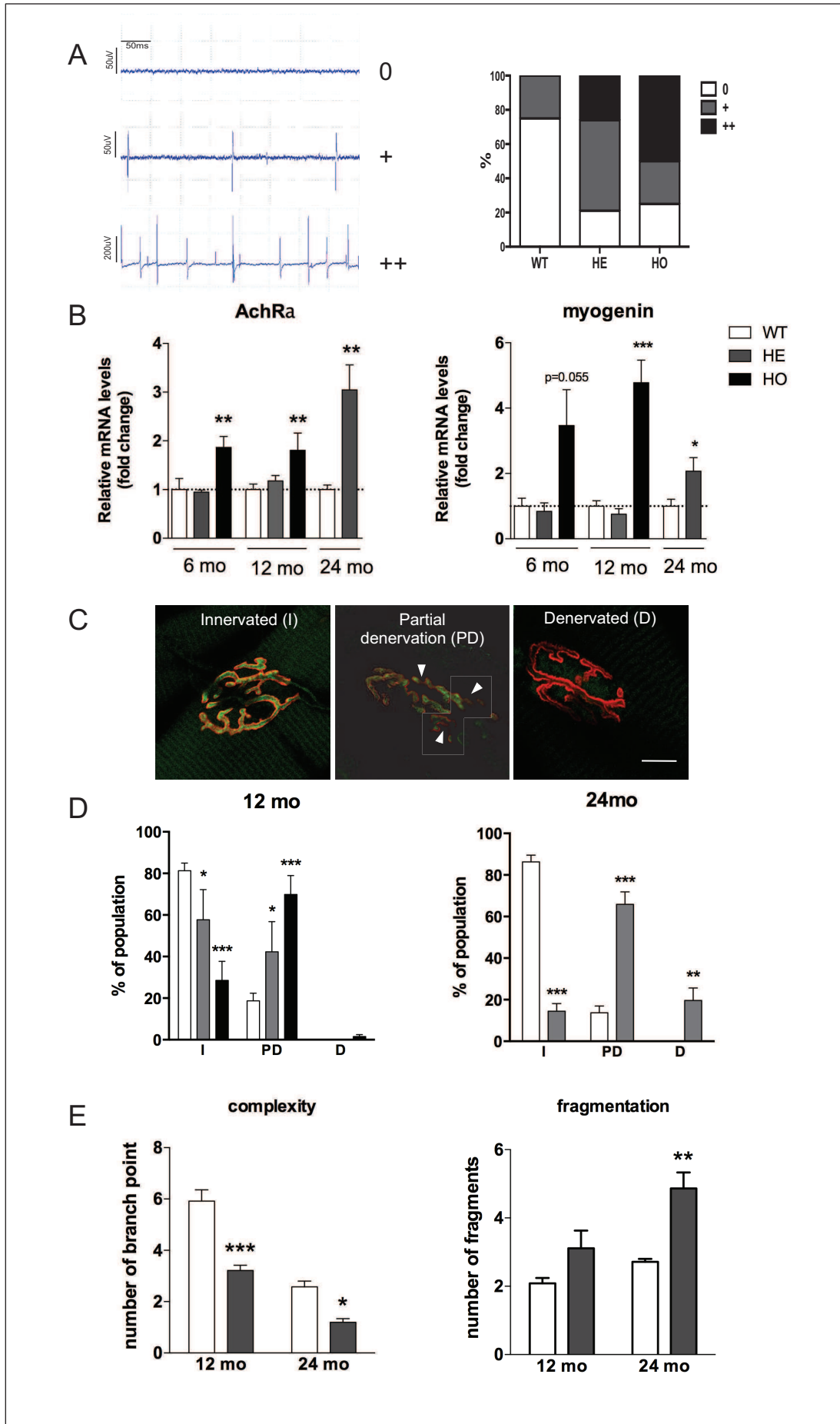


Figure 5: CHMP2B^{intron5} mice develop a distal axonopathy.

A: Left: Representative electromyography recording used for scoring the mice. 0: normal profile without abnormal electrical activity, 1: presence of few fasciculations; 2: Fasciculations and fibrillations are present. Fasciculations and fibrillations are indicative of muscle fibre denervation and motor unit degeneration. Right: percentage of mice presenting with abnormal EMG recording according to the above scale at end-stage. Wt: n=8; HE: n= 19; HO: n=8

B: mRNA levels of denervation markers AchRa and myogenin in gastrocnemius muscle at 6, 12 and 24 months of age. Denervation markers are significantly induced in HO and HE mice of respectively 6 and 12 months of age compared to WT littermates. Values are the mean±SEM, WT: n=6; 9; 8, HE: n=5; 9; 10; HO n=6; 4. *p<0.05; **<0.01; ***<0.0001, one-way ANOVA followed by uncorrected Fisher's LSD.

C: Representative confocal photographs showing typical innervated (I) partially denervated (PD, arrowhead), and denervated NMJs in *tibialis anterior*. AChR are labelled with fluorescent α -BGT binding (red), and nerve terminals are labelled by immunocytochemistry of synaptophysin (green). Scale bar: 20 μ m

D: Quantification of innervation in WT, HE and HO mice at 12 and 24 months of age. Histograms represent the mean±SEM, n=5/genotype and age. *p<0.05, **p<0.005, ***p<0.0001, one-way ANOVA followed by uncorrected Fisher's LSD.

E: Morphometric analysis of the post-synaptic apparatus formed by AChR clusters in *tibialis anterior* of HE and WT mice at 12 and 24 months of age. Histograms represent the mean±SEM, n=6 and 3 genotype at respectively 12 and 24 months.*p< 0.05 , **p<0.01, ***p<0.0001, one-way ANOVA followed by uncorrected Fisher's LSD.

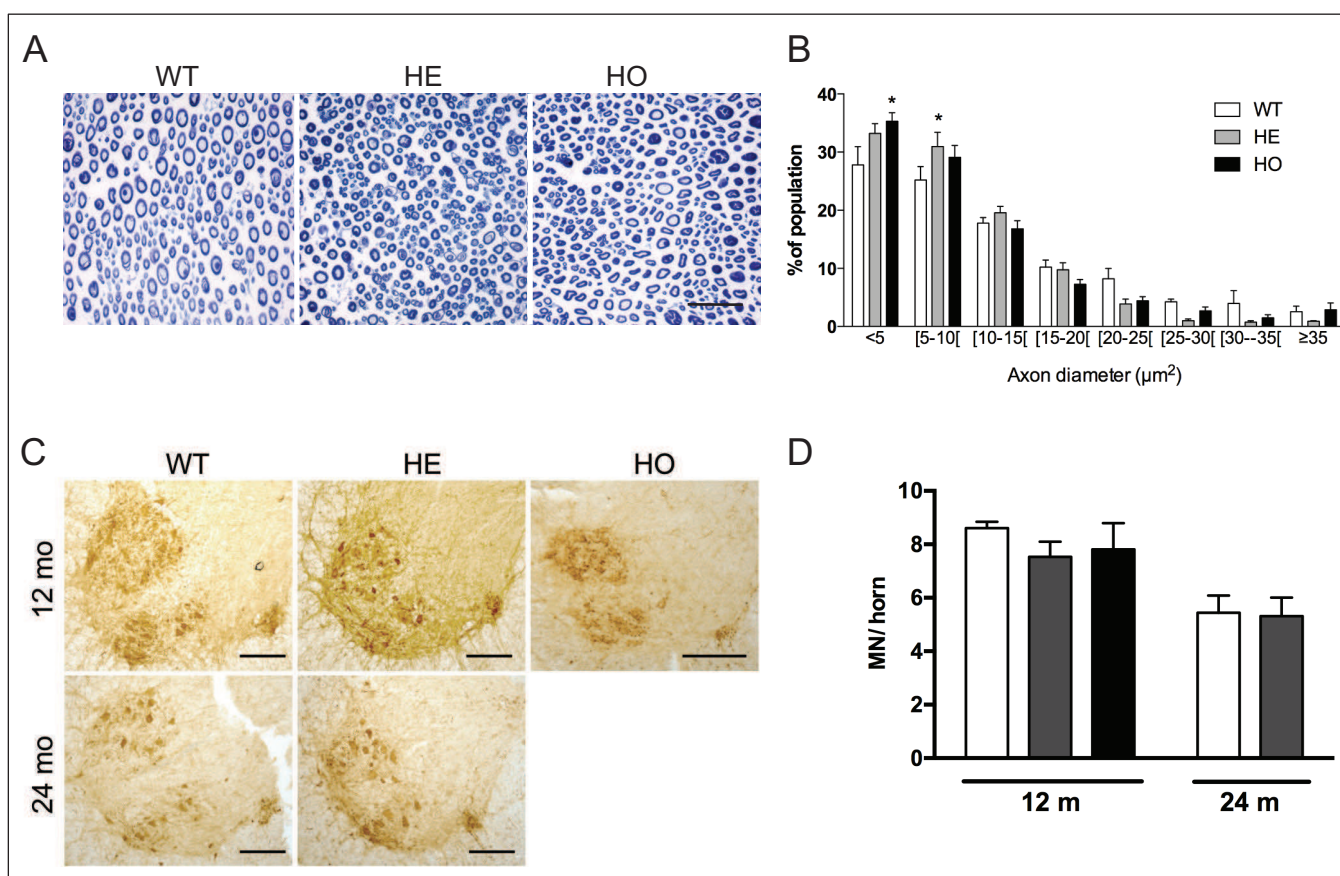


Figure 6: Soma of motor neurons are preserved although sciatic nerve shows signs of degeneration.

A: Representative photomicrographs of myelinated axons within the sciatic nerve of WT, HE and HO mice at the end-stage. Scale bar: 50 μm .

B: Distribution of myelinated axons diameter. The number of small calibre axons increases in HO and HE mice compared to WT while the number of large calibre axons decreases. Histograms represent the mean \pm SEM, n=4/genotype, *p<0.05, one-way ANOVA followed by uncorrected Fisher's LSD.

C: Representative photomicrographs of ChaT immunostaining showing motor neurons in lumbar spinal cord of WT, HE and HO mice at 12 and 24 months of age. Scale bar: 100 μm .

D: Quantification of the number of motor neurons in lumbar spinal cord of WT, HE and HO mice at 12 and 24 months of age after ChaT immunostaining. Histograms represent the mean \pm SEM.

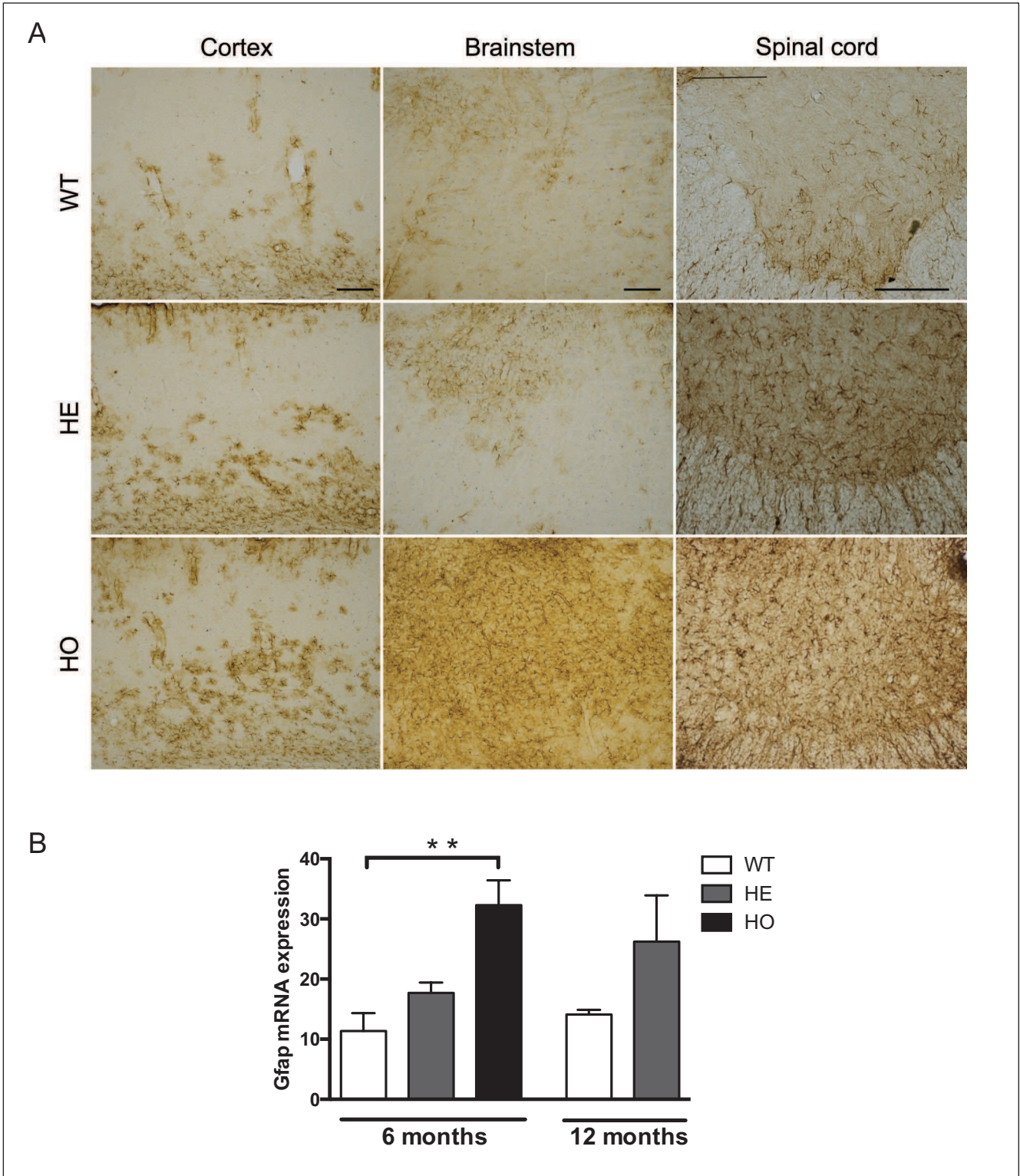


Figure 7: Astrocytosis increases with age in CHMP2B^{intron5} mice.

A: Representative photomicrographs showing GFAP immunoreactivity in cortex, brainstem and lumbar spinal cord of WT, HE and HO mice at 6 months of age. Scale bar: 100 μ m.

B: GFAP mRNA levels in the brain of WT, HE and HO mice at 6 and 12 months of age. Histograms represent the mean \pm SEM, n=4-6, *p<0.05, **p<0.005, one-way ANOVA followed by uncorrected Fisher's LSD.

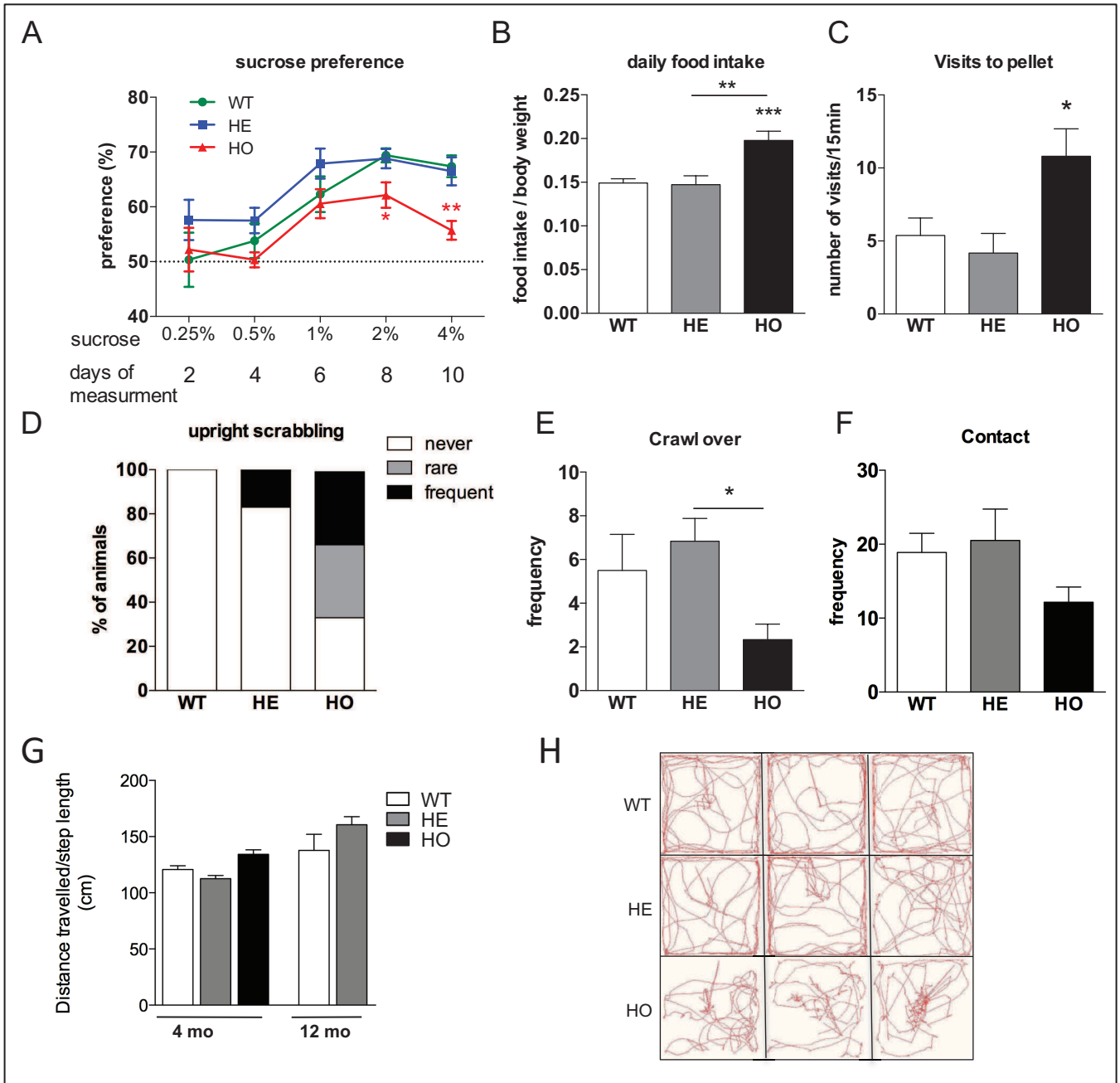


Figure 8: CHMP2^{intron5} mice show altered behavior.

A: Sucrose preference test performed at 5 months of age. Note that sucrose preference is decreased in HO mice compared to HE and WT mice at 2% and 4% sucrose concentration. Values represent the mean±SEM, n=7-10, *p<0.05, **p<0.005, one-way ANOVA followed by uncorrected Fisher's LSD.

B: Food intake is increased in HO mice compared to HE and WT mice at 5 months of age. Values represent the mean±SEM, n=7-8, **p<0.005, ***p<0.001, one-way ANOVA followed by uncorrected Fisher's LSD.

C: Number of visits to food pellet over a 15 minutes period. Note the increased number of visits for the HO mice compared to HE and WT mice. Values represent the mean±SEM, n=7-8, *p<0.05, one-way ANOVA followed by uncorrected Fisher's LSD.

D-E: Evaluation of stereotypies at 5 months of age. Upright scrabbling (D) is increased in HO and HE mice while crawl over (E) and nose contact (F) are only decreased in HO mice when compared to WT littermates. For detailed procedure see material and methods section. Values represent the mean±SEM, n=6-8, *p<0.05, one-way ANOVA followed by uncorrected Fisher's LSD.

G: Quantification of the number of steps done during a 5 minutes period in an open-field. The total distance travelled is corrected by the step length of each animal. The number of steps is similar for the three genotypes at 4 and 12 month of age. Values represent the mean±SEM, n=8-12.

H: Representative tracks of 4 months old mice recorded during 3 minutes in an open-field. Note the altered pattern of HO mice compared to HE and WT mice.

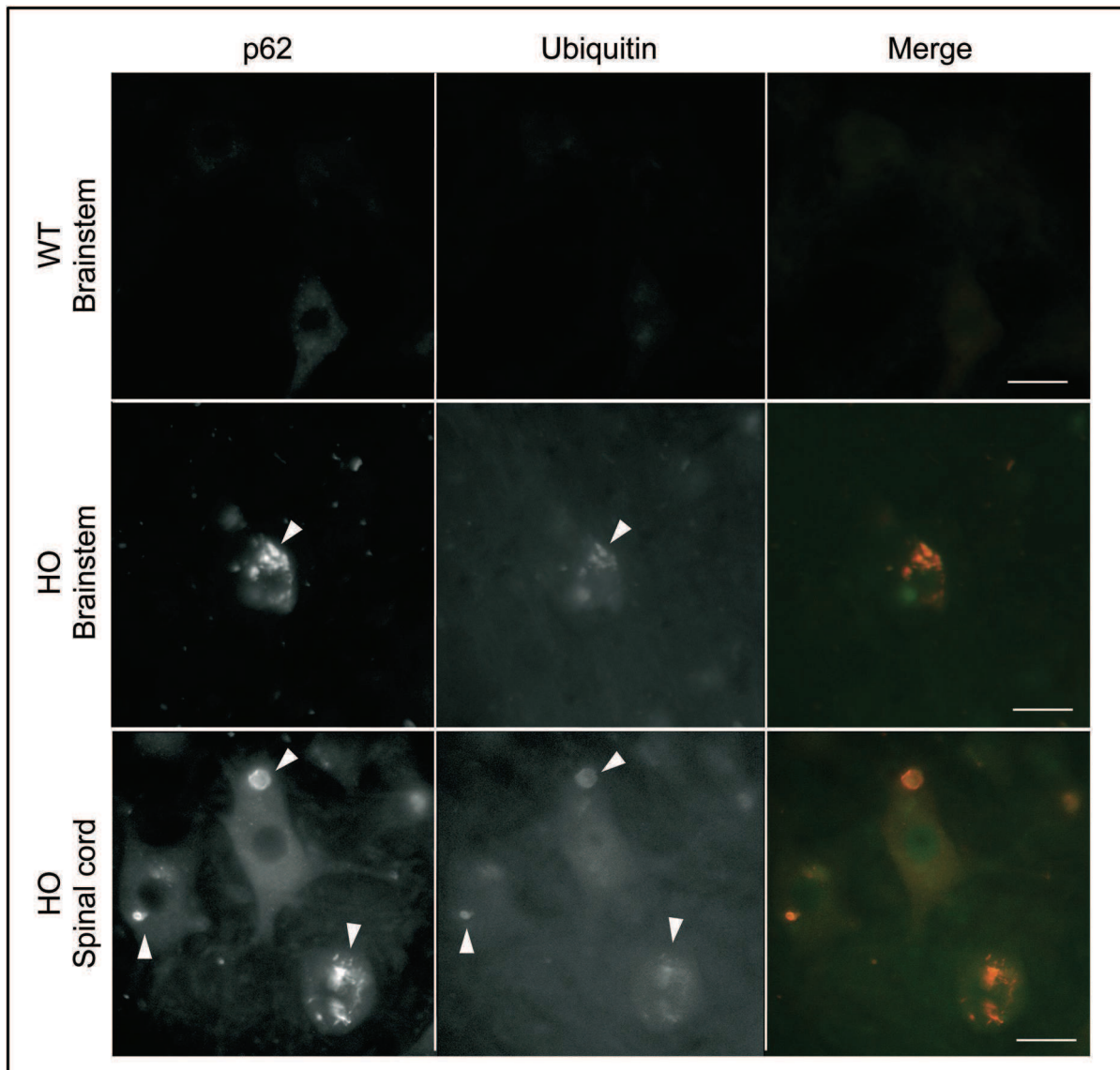


Figure 9: Double labelling for p62 (left) and ubiquitin (middle) showing large size p62 and ubiquitin positive inclusions (arrowhead) in the cytoplasm of neurons of 6 months old HO mice. In contrast, neurons from WT mice only show a faint diffuse cytoplasmic staining. Scale bar: 20 μ m

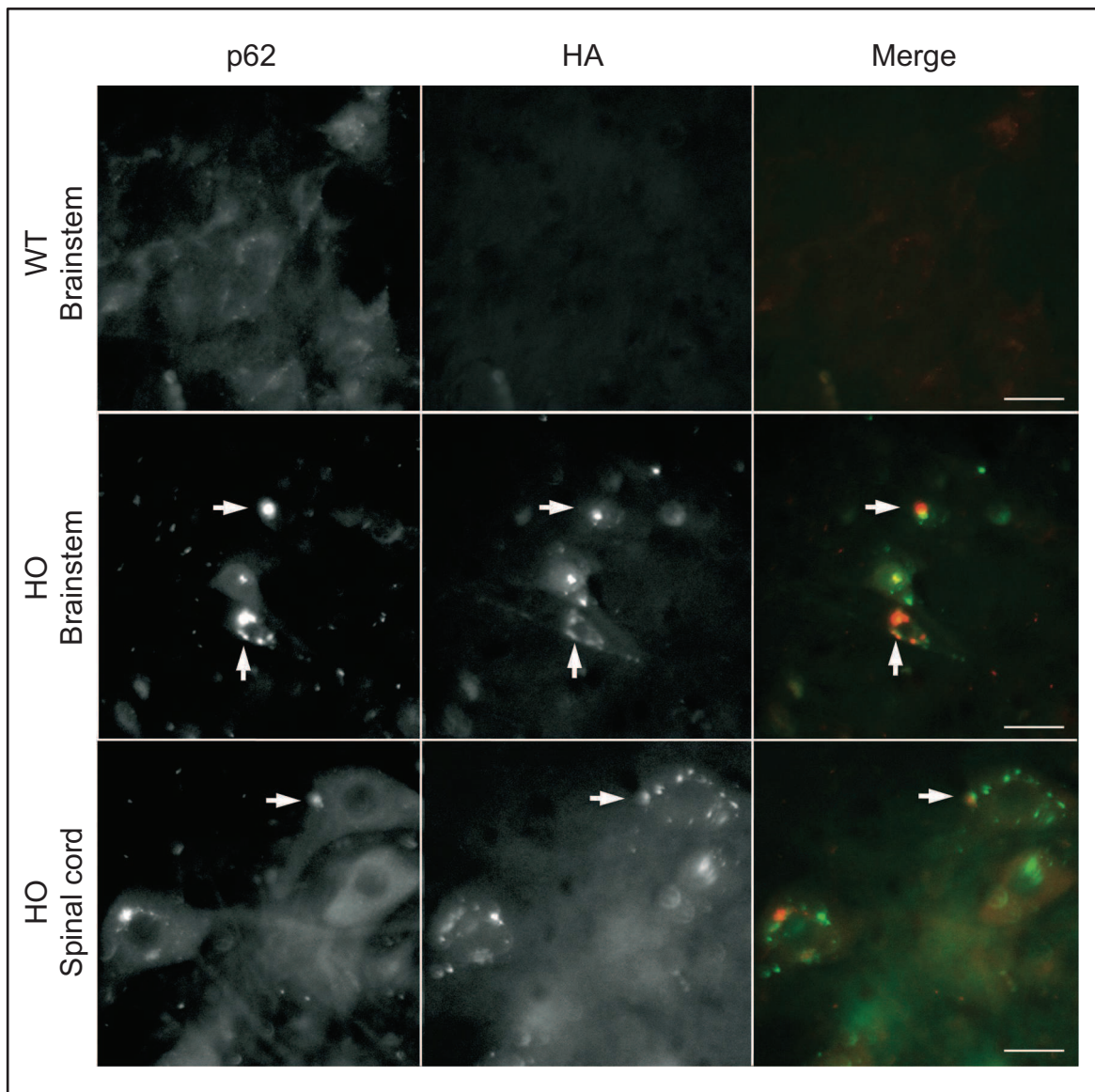


Figure 10: Double labelling for p62 (left) and HA (middle). Neurons of HO mice contain cytoplasmic inclusions positive for p62 or HA. In some HA and p62 inclusions are colocalized or in close apposition (arrowhead). Neurons from WT mice are devoided of HA immunoreactivity and show a faint diffuse cytoplasmic staining for p62. Scale bar: 20 μ m

	Structures/neuronal type	HA staining
Cerebral cortex	Cingulate cortex	+++
	Motor cortex	++
	Somato-sensory cortex	++
	Pyriiform cortex	+++
	Enthorinal cortex	+++
	Amygadala	+++
	Corpus callosum	-
Hippocampus	Dentate gyrus	++
	CA1	++
	CA2	+
	CA3	++
Basal ganglia	Striatum	-
	Pallidum	+++
	Substantia Nigra	+(+)
Brainstem	Thalamus	+++
	hypothalamus	-/+
Midbrain	Red nucleus	+++
	Colliculus>	+/-
	Periacqueducal gray	++(+)
	Reticular nucleus	+++
Hindbrain	Pons	++
Hindbrain	Medulla	+++
Cerebellum	Molecular layer interneurons	-/+
	Purkinje cells	-
	Granule cells	-/+
Spinal cord	Motorneurons	+++

Table 1 : Distribution and relative level of transgene immunoreactivity in the central nervous system. - : no staining ; -/+ : faint staining ; + : low staining ; ++ moderate staining, +++ strong staining.

	4-6 mo			10-15 mo			20-25 mo	
	WT (n=9)	HE (n=15)	HO (n=10)	WT (n=16)	HE (n=13)	HO (n=5)	WT (n=8)	HE (n=30)
GENERAL HEALTH								
Body weight (g)	27.1 ±0.45	27.5 ±0.49	17.4*** ±0.57	35.3 ±1.07	37.5 ±0.67	17.0*** ±0.67	40.18 ±0.57	33.08*** ±0.81
Skin color	N	N	N	N	N	N	N	N
Piloerection (%)	0	0	0	0	0	0	0	0
Lacrimation (%)	0	0	0	0	0	0	0	0
Palpebral closure	N	N	N	N	N	N	N	N
Body tone	N	N	N	N	N	N	N	N
Abdominal tone	N	N	N ↘	N	N	↘	N	↘ N ↗
MOTOR AND SENSORY FUNCTIONS								
Gait	N	N	A	N	N/A	A	N	A
Limb tone	N ↗	N ↗	N ↘	N ↗	N ↗	↘ ↗	↗	↗
Pelvic elevation	N	N	↗	N	N ↘	↗	N	↘
Tremors (%)	0	30	80	18	33.3	100	25	100
Twiches (%)	0	36.4	60	0	53.8	100	0	91
Stereotypies	0	0	100	0	20	100	0	50
Pinna reflex	N	N	N	N	N	N	N	N
Corneal reflex	N	N	N	N	N	N	N	N
Delayed Visual placing (%)	0	0	20	0	0	60	0	9.1
Positional passivity	N	N	N	N	N ↘	N	N ↘	↘
Altered Righting reflex	0	0	70	0	39	80	0	80
Provoked biting (%)	78	90	30	78	77	0	43	55
Vocalization (%)	0	0	0	0	0	0	0	0

Table 2: Longitudinal modified SHIRPA analyses of WT and CHMP2B^{intron5} tg mice. Analyses were performed at the indicated ages. A: altered; N: normal; ↘: decreased; ↗: increased Value: % of mice presenting the studied character or mean±SEM ***p<0.0001 one-way ANOVA followed by uncorrected Fisher's LSD.

II. Etude des fonctions cognitives chez les souris CHMP2B^{intron5}

A. Matériel et méthodes

1. Stratégie expérimentale

J'ai réalisé une batterie de tests sollicitant différentes aires du cerveau susceptibles d'être affectées dans un modèle de DFT. Deux groupes d'âges différents ont été testés afin d'évaluer deux stades de la pathologie liée à l'expression neurone-spécifique du mutant CHMP2B^{intron5}: un premier groupe de souris de 6 mois avec les trois génotypes WT (n=12), HE (n=12) et HO (n=7) a été testé afin d'étudier un stade où les souris HO présentent des atteintes motrices alors que les souris HE sont asymptomatiques d'un point de vue moteur. Un deuxième groupe de souris de 12 mois comprenant deux génotypes, WT (n=10) et HE (n=12), a été testé afin d'étudier le comportement des souris HE à un âge plus avancé.

Ces tests ont été réalisés en collaboration avec le Dr. Chantal Mathis et le Pr. Jean-Christophe Cassel, au Laboratoire de Neurosciences Cognitives et Adaptatives de Strasbourg. Le plan expérimental est présenté sur la figure 7.

- Les souris ont été stabulées en cage individuelle une semaine avant le premier test.
- L'inhibition exploratoire des souris a été étudiée grâce au test obscurité/lumière afin de savoir si les souris CHMP2B^{intron5} présentent une désinhibition.
- Deux tests d'exploration d'objets ont été réalisés. Le test de déplacement d'objet a été utilisé pour mesurer la mémoire spatiale. Ce test implique le cortex entorhinal. Le test de duplication d'objet a été utilisé afin d'étudier les fonctions liées au cortex préfrontal (Barker, Bird, Alexander, & Warburton, 2007).
- Le test du labyrinthe de Barnes a été utilisé afin d'étudier la mémoire spatiale exploratoire des souris, à court terme et à long terme.
- Le test du labyrinthe de Barnes inversé a été utilisé afin d'étudier la flexibilité comportementale des souris.
- L'activité des souris dans leur cage a été suivie sur trois jours.

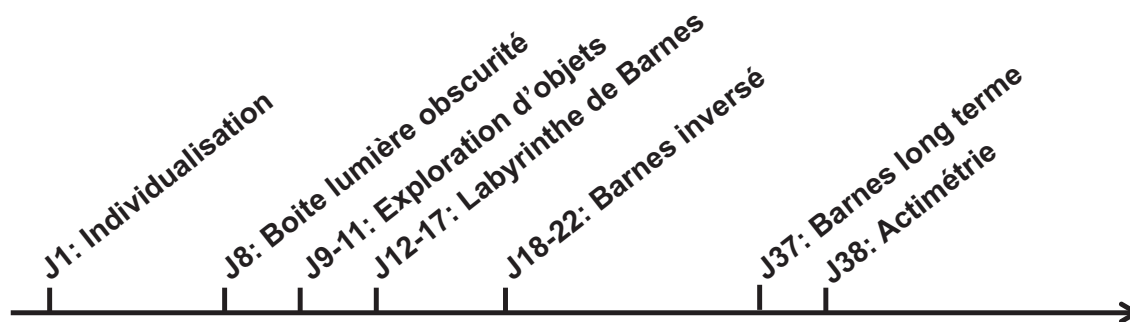


Figure 7 schéma du protocole expérimental d'évaluation du comportement

2. Test obscurité/lumière

Le comportement d'exploration des souris lors du test obscurité/lumière a été étudié pendant la période de jour de l'animalerie, en fin d'après midi. L'appareil est constitué de deux compartiments de taille identique ($18,5 \times 18,5 \times 15\text{cm}^3$) l'un opaque et l'autre transparent, séparés par un tunnel opaque ($5 \times 5,5 \times 5\text{cm}^3$). La luminosité dans le compartiment transparent est de 400 lux. Les souris sont déposées dans le compartiment obscur. La latence avant la première transition vers le compartiment lumineux, le nombre de transitions entre les deux compartiments et le temps passé dans chaque compartiment sont mesurés pendant 8 minutes.

3. Tests de reconnaissance d'objets

Nous avons réalisé deux tests basés sur la reconnaissance d'objets et de leur localisation, permettant d'évaluer la mémoire spatiale et la mémoire contextuelle des souris. Les tests sont réalisés dans un open field (arène de $40 \times 60 \times 50\text{cm}^3$) aux bords opaques. Le jour 1, les souris sont familiarisées avec l'open field pendant 8 minutes en présence de deux objets (ananas et boîte blanche). Le jour 2, les souris sont à nouveau placées 8 minutes dans l'open field en présence de deux autres objets placés différemment (carafe et verre bleu). Ces sessions d'exploration pendant les deux premiers jours correspondent à la phase d'habituation, pendant laquelle les souris se familiarisent avec l'arène et l'expérimentateur. Le jour 3 est divisé en 3 sessions d'exploration de 8 minutes dans l'open field séparées par 3 minutes dans la cage. La première session

correspond à la phase d'acquisition, pendant laquelle la souris explore les nouveaux objets. La deuxième session correspond à une phase de rétention pour le test de déplacement d'objet. La troisième session correspond à une phase de rétention pour le test de duplication d'objets. Le protocole est schématisé sur la figure 8. La préférence des souris pour l'objet qui a été déplacé ou dupliqué indique leur apprentissage de la place et de la nature des objets présents dans l'arène. Cette préférence est définie par l'indice d'exploration, calculé comme suit: temps d'exploration de l'objet déplacé ou dupliqué divisé par la somme du temps d'exploration de chaque objet au cours d'une session.

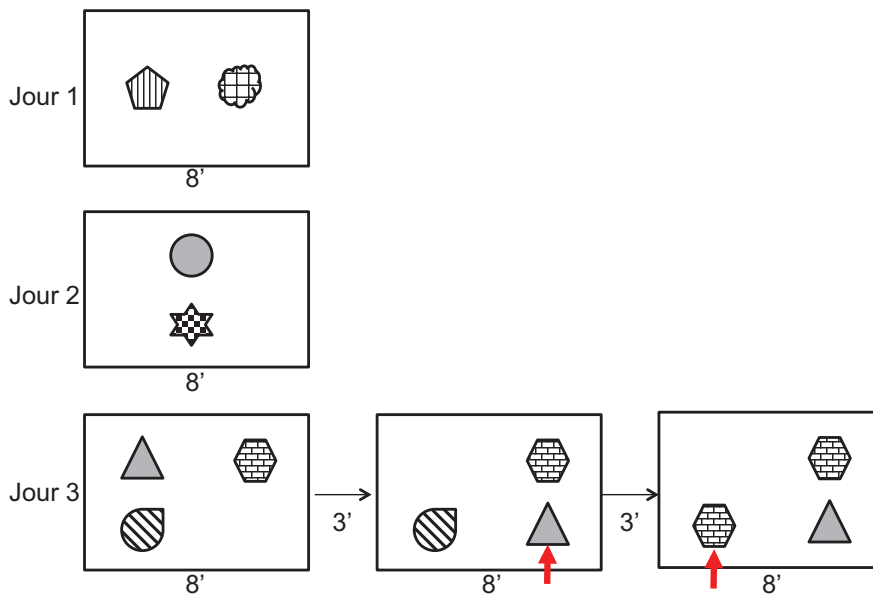


Figure 8 Schéma du protocole d'exploration d'objets

Aux jours 1 et 2 ont lieu deux sessions d'habituation, La session 1 du jour 3 correspond à l'acquisition. La session 2 du jours 3 correspond à la phase de rétention pour le test de déplacement d'objet. La session 3 du jour 3 correspond à la phase de rétention pour le test de duplication d'objets. les flèches rouges indiquent les objets déplacés ou dupliqués.

4. Labyrinthe de Barnes

Le labyrinthe de Barnes a été utilisé pour tester l'apprentissage et la mémoire spatiale des souris. Ce test est basé sur la capacité naturelle des souris à s'échapper d'un environnement ouvert inconfortable à travers un petit trou. Ce test est mieux adapté aux souris que les tests nécessitant la nage comme le labyrinthe dans l'eau (water maze). De plus il fait appel à la fois au sens visuel et olfactif des souris, ce qui nous affranchis de la question des capacités visuelles des souris pour réussir le test (Yassine et al., 2013).

Le labyrinthe de Barnes est constitué d'une plateforme circulaire de 1m de diamètre de couleur noire, à une hauteur de 70cm. Douze trous de 4cm de diamètre sont répartis de façon équidistantes à la périphérie de la plateforme. Un tuyau souple est utilisé pour connecter l'un des trous à la cage de la souris qui est déposée en contrebas de la plateforme. Le labyrinthe est éclairé par une lumière de 400 lux au centre de la plateforme. Les souris sont entraînées à retrouver le trou cible connecté à leur cage alors que les onze autres trous sont bouchés. Pour chaque souris, la cible reste toujours à un même emplacement dans le référentiel de la pièce. La souris peut se guider grâce à des indices visuels, olfactifs et sonores fixes, tels que des posters au mur, un évier, le son d'une radio dans la pièce, les autres souris et l'expérimentateur lui même. Les souris sont déposées au centre de la plateforme et explorent librement la plateforme jusqu'à trouver la cible dans laquelle elles se réfugient généralement pour rejoindre leur cage. Si au bout de trois minutes une souris n'a pas trouvé la cible ou n'a pas rejoint sa cage, elle est dirigée délicatement vers la cible par l'expérimentateur. Après chaque essai, la plateforme est rincée avec un gant mouillé d'eau et est tournée pour limiter les indices olfactifs à l'intérieur du labyrinthe. Chaque souris réalise trois essais par jours pendant cinq jours. Le sixième jour, les souris sont soumises à une première épreuve: la souris est déposée au centre de la plateforme de façon identique aux essais, mais les 12 trous sont bouchés. La souris est laissée en exploration sur la plateforme pendant deux minutes. L'épreuve est suivie de trois essais le même jour. Une seconde épreuve est réalisée 15 jours après ce dernier apprentissage pour mesurer la mémoire à long terme. Pour chaque essai, le temps avant de trouver la cible et le nombre d'erreur sont mesurés. Pour l'épreuve, un indice d'exploration est calculé à partir du nombre de visites à la cible divisé par le nombre total de visites.

5. Labyrinthe de Barnes inversé

Afin de tester la flexibilité mentale des souris, un test du labyrinthe de Barnes inversé a été réalisé. La flexibilité mentale est la capacité à s'adapter pour apprendre de nouvelles règles. Après la première épreuve sur le labyrinthe de Barnes, les souris reçoivent un entraînement de trois essais supplémentaires. Le lendemain, la cible est déplacée à l'opposée de son emplacement initial sur la plateforme. Les souris réalisent un nouvel apprentissage de trois essais par jour pendant quatre jours. Le cinquième jour, les souris passent l'épreuve définie plus haut.

6. Actimétrie

L'activité des souris a été enregistrée à l'aide d'un appareil d'actimétrie. Les souris sont placées dans des cages individuelles adaptées à l'appareil. Deux faisceaux infrarouges traversent la cage dans la largeur aux deux extrémités de la cage, à 2,5 cm du sol de la cage. Un déplacement est comptabilisé lorsque la souris coupe les deux faisceaux à moins d'une minute d'intervalle.

7. Statistiques

Le logiciel Prism a été utilisé pour les analyses statistiques. Lorsque deux groupes sont comparés ou lorsqu'un groupe est comparé à une valeur théorique, un test de Student a été réalisé. Lorsque plus de deux groupes sont comparés, un test anova suivi d'un test de comparaison multiple de Tukey a été réalisé.

Résultats

8. Etat d'inhibition des souris CHMP2B^{intron5}

Les patients DFT présentent de façon courante un comportement désinhibé. Cela se manifeste notamment par une impulsivité et une inconscience des conséquences d'un acte. Ce type de comportement est mesuré chez la souris avec des tests d'anxiété. Une diminution de l'anxiété chez les souris est alors interprétée comme une désinhibition.

Nous avons utilisé le test obscurité/lumière pour évaluer l'état de désinhibition des souris CHMP2B^{intron5}. A l'âge de 6 mois, comme à 12 mois (Figure 9), les souris WT explorent le compartiment lumineux pendant environ 30% du temps total d'exploration (8 minutes). Elles ont donc une préférence pour le compartiment obscur, conformément à ce qui a été observé dans d'autres études. Aux deux âges, les souris transgéniques ne passent pas plus de temps dans la partie lumineuse que les souris non transgéniques. Les souris CHMP2B^{intron5} HE ou HO ne présentent donc pas de désinhibition par rapport aux souris non transgéniques, aux deux âges testés. Le nombre de transitions d'un compartiment à l'autre est le même à 6 mois entre les souris WT et HO. Ceci montre que les souris HO de 6 mois ont la même capacité et la même motivation que les WT pour explorer l'environnement de la boîte lumière obscurité. Les souris HE de 6 mois présentent une tendance à l'augmentation du nombre de transitions par rapport aux souris WT et HO, et cette différence est statistiquement significative par

rapport aux souris HO. Par contre, cette augmentation du nombre de transitions n'est plus visible à 12 mois. Une augmentation du nombre de transitions peut être interprétée comme un signe d'hyperactivité. Les souris transgéniques HE présentent donc une légère hyperactivité transitoire à 6 mois qui n'apparaît plus à 12 mois.

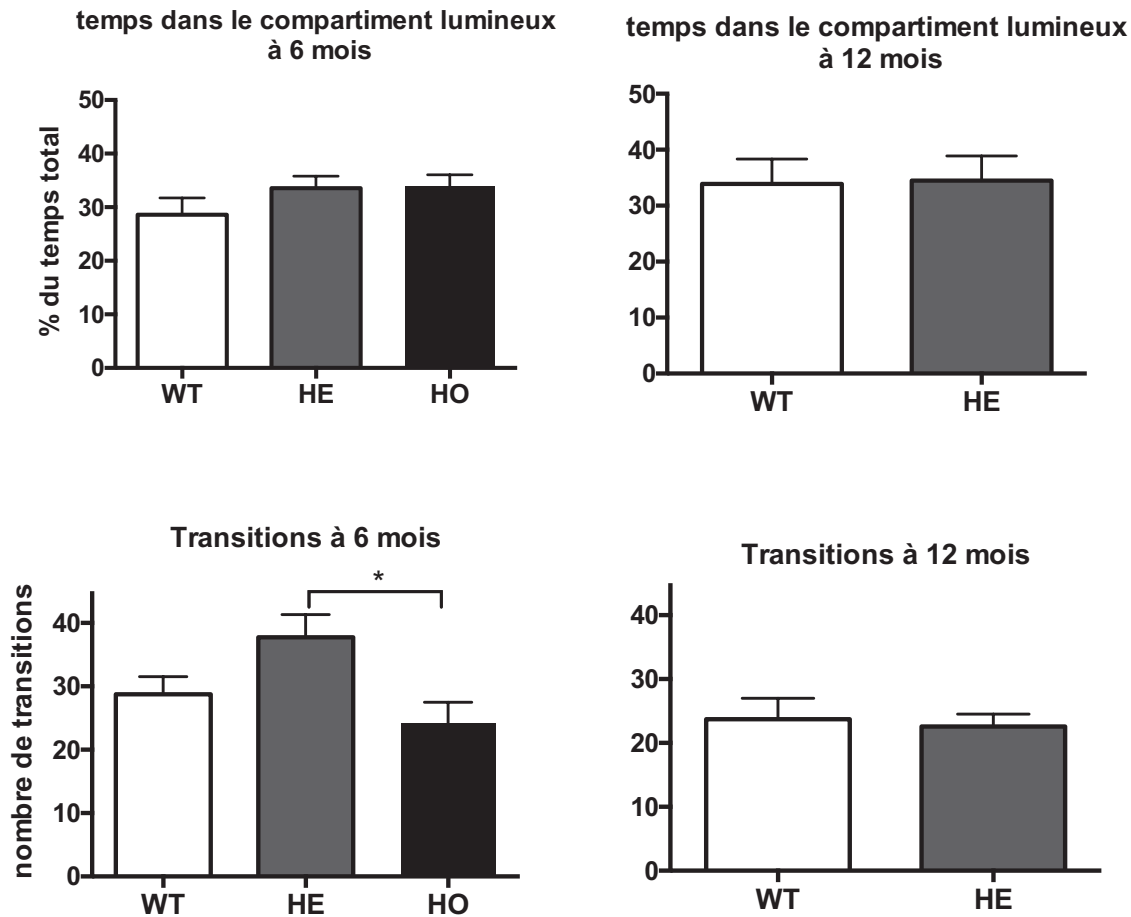


Figure 9: Exploration lors du test obscurité/lumière des souris CHMP2B^{intron5}.

Les souris HE et HO passent autant de temps dans le compartiment lumineux que les souris WT, à 6 mois et à 12 mois. A 6 mois, les souris HE passent plus souvent d'un compartiment à l'autre que les souris WT et HO. A 12 mois, les souris HE changent autant de compartiment que les souris WT. Statistiques: test anova suivi d'un test de comparaison multiple de Tukey

9. Exploration d'objets

La mémoire des animaux a été testée dans les tests d'exploration d'objets, basés sur la tendance naturelle des souris à explorer des objets nouveaux ou des objets dans une nouvelle localisation.

Le temps passé par les souris à explorer chaque objet est présenté sur la figure 10. A 6 mois, les souris HO explorent moins les objets que les souris WT et HE, mais cet effet n'est statistiquement significatif que pour les objets nouveaux. En effet,

l'exploration par les souris HO des objets savon 2, cola 2 et red bull 2 (explorés pour la deuxième fois) ainsi que savon 3, cola 3 et cola3 bis (explorés pour la troisième fois) n'est pas significativement différente des WT et HE, malgré une tendance à la baisse. Cette différence n'est pas due à un défaut global d'exploration dans l'open field, car les souris HO ont montré un niveau de déplacements similaire aux souris WT et HE dans un open field sans objets (figure du papier). Cette différence pourrait donc s'expliquer par un désintérêt des souris HO pour des objets nouveaux. On peut remarquer aussi que les souris de 6 mois passent moins de temps à explorer les objets que les souris de 12 mois. Par ailleurs, les souris ne présentent pas de préférence pour un objet en particulier.

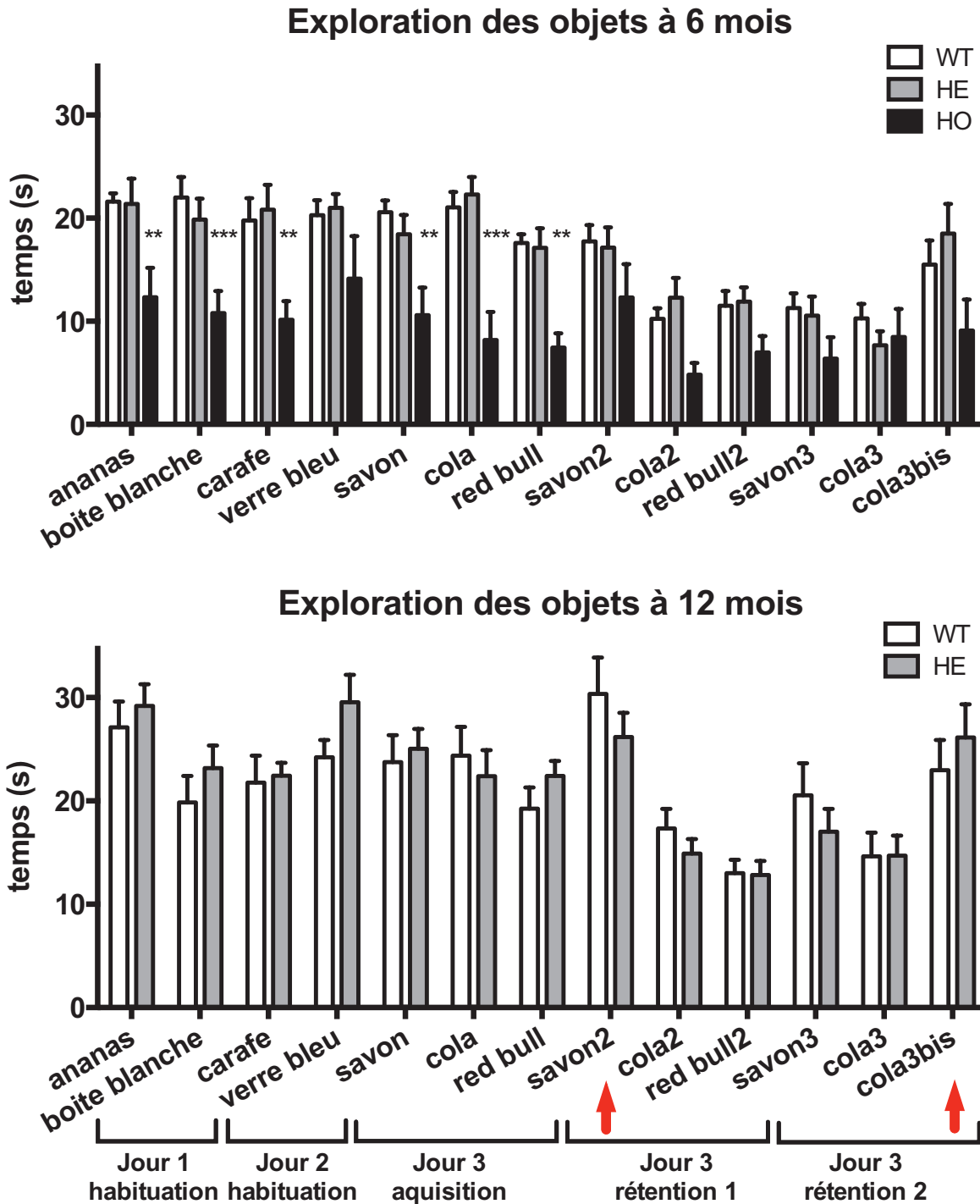


Figure 10 temps d'exploration des objets

Temps passé par les souris à explorer chaque objet au cours des cinq sessions dans l'open field. Les chiffres 2 ou 3 indiquent que les objets ont déjà été explorés lors des sessions précédentes. Les flèches indiquent les objets qui ont été déplacés (savon 2) ou remplacés (cola 3 bis). Statistiques: anova à 2 voies suivie d'un test de comparaison multiple de Tuckey entre WT et HO

Le test de déplacement d'objet évalue la mémoire spatiale n'impliquant pas de navigation et est dépendant du cortex entorhinal (Van Cauter et al., 2013). La figure 11

présente les résultats du test de déplacement d'objet, correspondant à la deuxième session du jour 3. A 6 mois, comme à 12 mois, les souris explorent préférentiellement l'objet qui a été déplacé. En effet, pour tous les animaux, l'indice d'exploration est statistiquement significativement différent du hasard, pour lequel l'indice d'exploration est 0,33. De plus, il n'y a pas de différence d'indice d'exploration entre les groupes d'animaux. Les souris CHMP2B^{intron5} ne présentent donc pas de défaut de mémoire spatiale impliquant le cortex entorhinal.

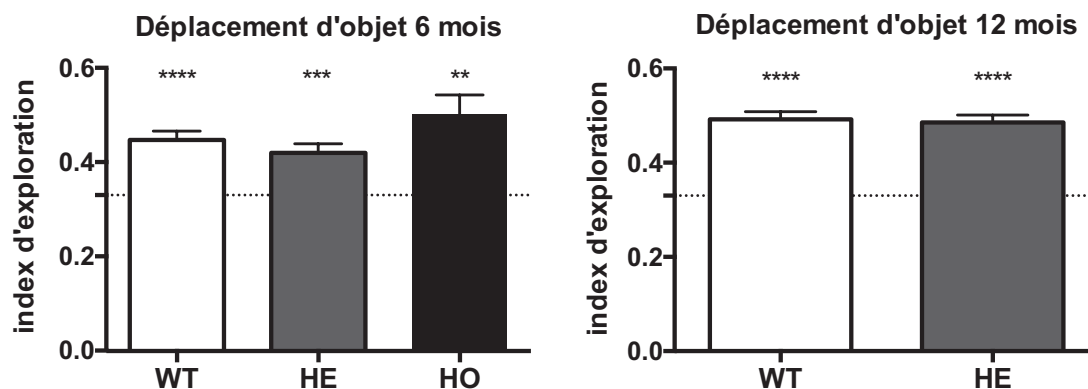


Figure 11: Déplacement d'objet

Les souris transgéniques présentent un indice d'exploration normal par rapport aux souris WT. les pointillés correspondent à la valeur d'une exploration identique des trois objets (0,33), donc une absence de rétention. statistique: test de Student par rapport à la valeur théorique 0,33. ** $p < 0,1$, *** $p < 0,01$, **** $p < 0,001$

Le test de duplication d'objet réalisé au cours de la troisième session du troisième jour implique le cortex préfrontal. Les résultats du test sont présentés figure 12. A 6 mois, seul le groupe des souris HE montre une préférence significative pour l'objet dupliqué. Les souris WT et HO explorent au hasard les objets, pourtant, les souris WT ont une tendance presque significative à explorer préférentiellement l'objet dupliqué, ce qui n'est pas le cas de souris HO. A 12 mois, les souris explorent préférentiellement l'objet dupliqué. Les souris HE n'ont donc pas d'atteinte au niveau du cortex préfrontal par rapport aux souris WT et sont même plus performantes que les souris WT à 6 mois.

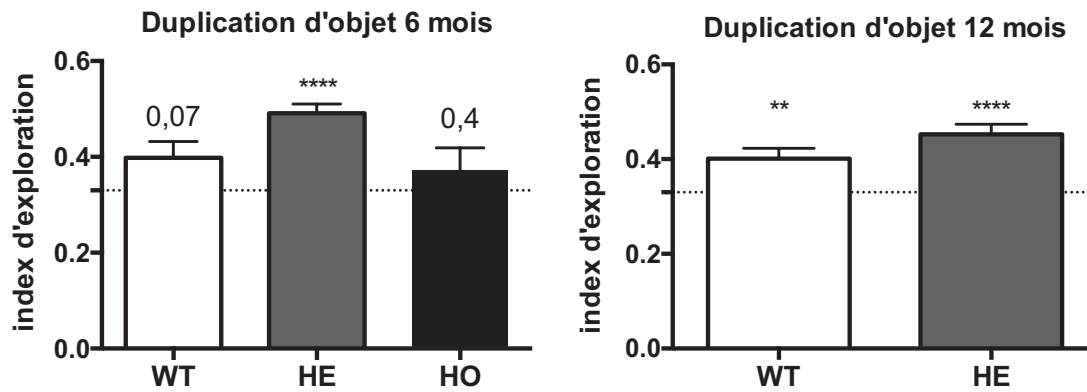


Figure 12 Duplication d'objets

L'indice d'exploration est présenté pour les souris de 6 mois et 12 mois. Les souris transgéniques présentent un indice d'exploration normal par rapport aux souris WT. Les pointillés correspondent à la valeur d'une exploration identique des trois objets (0,33), donc une absence de rétention. statistique: test de Student par rapport à la valeur théorique 0,33. ** $p < 0,1$, **** $p < 0,001$

10. Evaluation de la mémoire spatiale

Les performances des souris ont été testées dans le labyrinthe de Barnes, qui évalue la mémoire spatiale et implique l'hippocampe. Le nombre d'erreurs et le temps écoulé avant de trouver la cible (figure 13 A et B) s'améliore statistiquement en fonction des essais pour tous les groupes, à 6 mois et à 12 mois. Les souris CHMP2B^{intron5} HE et HO réalisent d'aussi bonnes performances d'apprentissage que les souris WT à 6 mois et à 12 mois, et ceci est visible avec le nombre d'erreurs et la latence avant de visiter la cible. Toutefois, les souris HO sont plus lentes à rejoindre la cible que les souris HE et WT et présentent une grande variabilité de latence. On remarque qu'à 12 mois, les souris font un nombre d'erreurs inférieur au hasard dès le premier jour d'apprentissage et ont un temps de latence plus court qu'à 6 mois le premier jour, ce qui peut indiquer un biais par la présence d'indices les aidant à trouver la cible (l'odeur de la cage connectée à la cible, par exemple). Ce biais ne semble cependant pas présent pour la cohorte de souris de 6 mois et n'empêche pas d'observer l'amélioration des performances des animaux.

Lors de la première épreuve réalisée le sixième jours (Figure 13C), on observe que les souris de 6 mois et de 12 mois visitent préférentiellement la cible quel que soit le génotype. Les souris transgéniques réalisent des performances comparables aux souris WT. En revanche, Les souris HO de 6 mois montrent même de meilleures performances

puisqu'elles visitent significativement plus la cible que les souris WT. La seconde épreuve a été réalisée 15 jours après l'apprentissage pour évaluer la mémoire à long terme des souris. On peut observer sur la figure 13D que les souris transgéniques de 6 mois et 12 mois réalisent quel que soit leur génotype des performances comparables à celles des souris non transgéniques lorsque l'on teste leur mémoire à long terme.

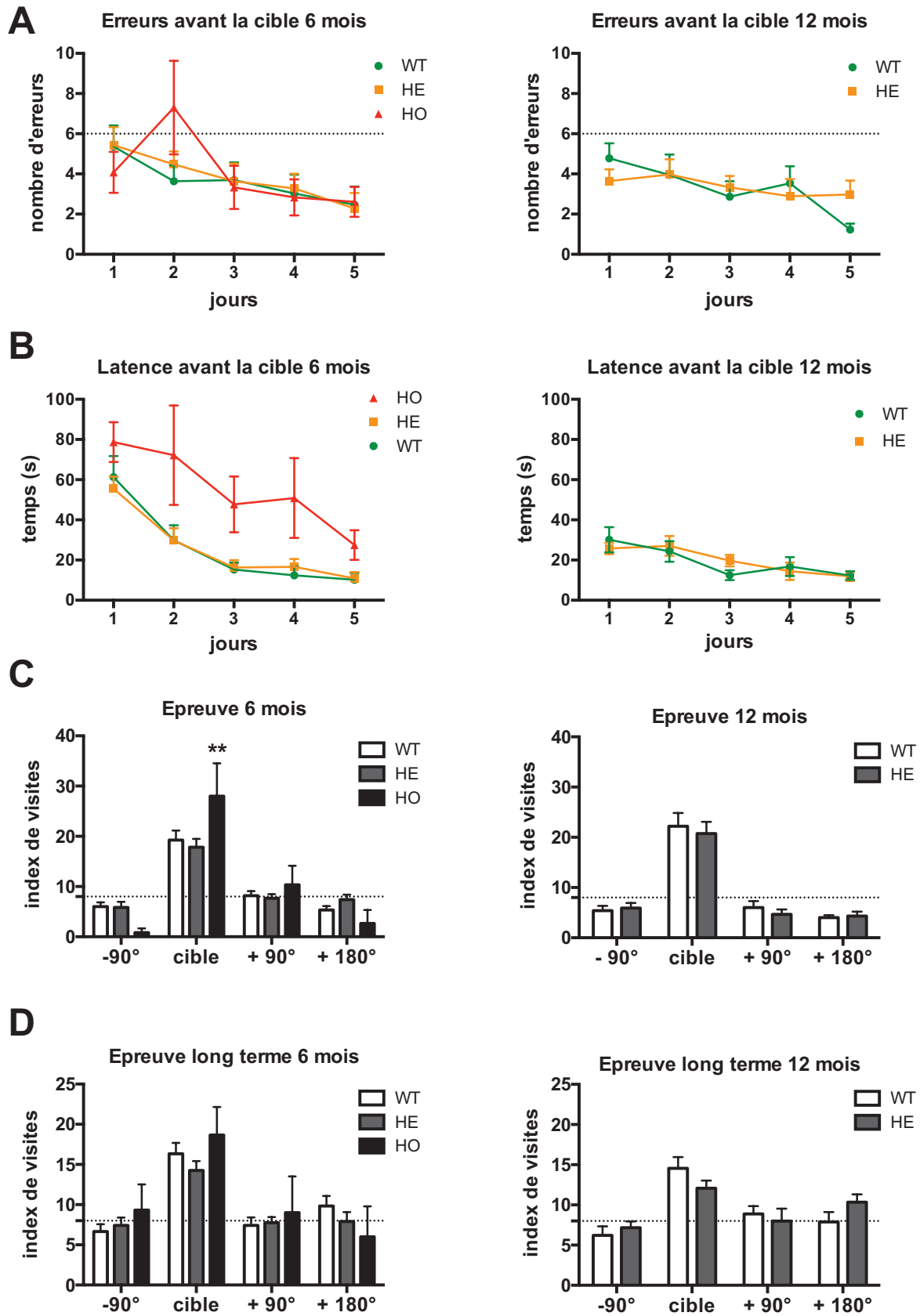


Figure 13 Apprentissage et mémoire dans le labyrinthe de Barnes

A. Nombre de visites avant de visiter la cible. B. Temps d'exploration sur la plateforme avant de visiter la cible. C. Indice des visites lors de l'épreuve, à la cible et à 3 autres trous contrôles. D.

Indice des visites lors de l'épreuve 15 jours après le dernier apprentissage. Les pointillés représentent la valeur théorique 8 correspondant au hasard. Statistique: anova à deux voies, suivie d'un test de comparaison multiple de tukey entre WT et les autres groupes.

Les souris peuvent utiliser différentes stratégies pour retrouver la cible. La première stratégie consiste à explorer les trous de proche en proche jusqu'à trouver la cible (stratégie sérielle). La deuxième stratégie est utilisée par la souris lorsque celle-ci connaît l'emplacement de la cible et consiste à visiter directement la cible, avec la possibilité de faire une erreur en visitant un trou à côté de la cible (stratégie directe). La dernière stratégie est définie par toutes les autres possibilités de visites avant de visiter la cible (stratégie mixte). Les stratégies utilisées par les souris sont présentées figure 14. On voit que les souris utilisent de plus en plus la stratégie directe au cours des jours d'apprentissage. Les souris transgéniques HE et HO utilisent autant cette stratégie que les souris non transgéniques. Lorsqu'on analyse l'utilisation des différentes stratégies sur l'ensemble des cinq jours d'apprentissage (figure 14 bas), on voit que les souris transgéniques et non transgéniques ont la même utilisation des stratégies sur le test du labyrinthe de Barnes.

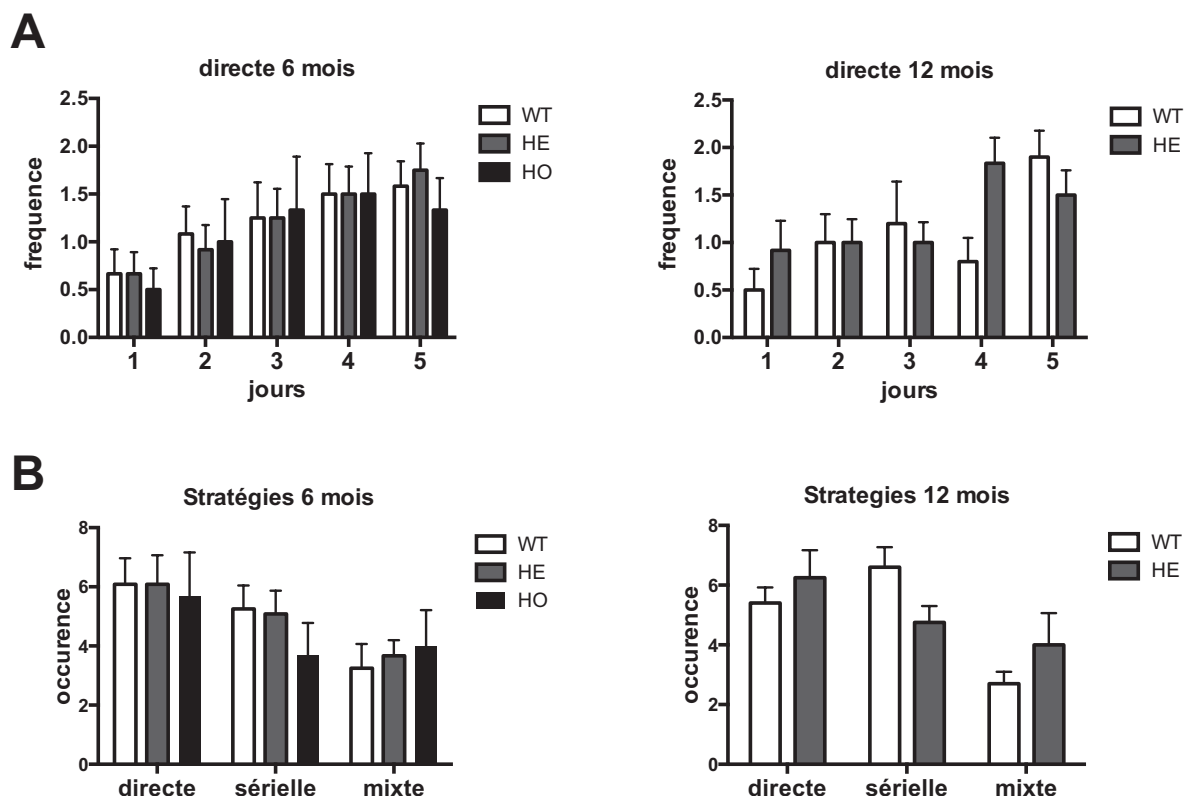


Figure 14 Stratégies sur le labyrinthe de Barnes

A. Fréquence de stratégie directe sur les 3 essais de chaque jour d'acquisition. B. Occurrence totale de chaque stratégie sur les 5 jours d'acquisition.

Le fait de visiter un trou qui a déjà été visité au cours du même essai, c'est à dire la répétition d'erreur, peut être interprété comme un défaut de concentration ou de mémoire de travail des souris. Comme les patients DFT présentent des défauts de concentration influençant leur mémoire de travail (Johns et al., 2009), nous avons mesuré ce paramètre chez les souris dans le labyrinthe de Barnes. Le nombre d'erreurs répétées au cours d'un essai a été compté et est présenté figure 15. Les souris transgéniques ne font pas plus d'erreur que les souris contrôles à 6 mois et 12 mois, cependant, les souris HO montrent une tendance à l'augmentation.

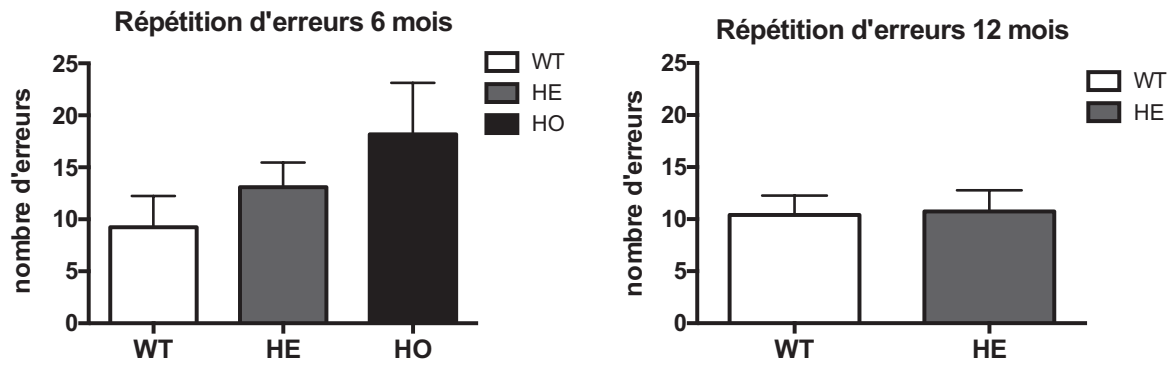


Figure 15: Répétition d'erreurs dans le labyrinthe de Barnes

Le nombre de fois où une souris visite un trou déjà visité au cours du même essai a été comptabilisé sur l'ensemble des 5 jours d'apprentissage.

11. Mesure de l'inflexibilité comportementale

Nous avons testé le niveau de flexibilité comportementale des souris CHMP2B^{intron5} dans le labyrinthe de Barnes inversé. La figure 16A montre le nombre de visites à l'ancien emplacement de la cible, durant les 3 essais du premier jour. On observe que lors du premier essai, les souris visitent plusieurs fois l'ancienne cible avant de trouver la nouvelle cible. Puis, lors des deux essais suivants, elles visitent de moins en moins l'ancienne cible, ce qui montre qu'elles ont appris que la cible avait changé de place. Parallèlement, les souris améliorent leurs performances pour trouver la nouvelle cible dès les trois essais du premier jour et au cours des jours d'apprentissage suivants (figure 16 B et C). Les souris transgéniques montrent d'aussi bonnes performances de réapprentissage dès le premier jour que les souris WT et ne présentent donc pas d'inflexibilité comportementale. De plus, les résultats de l'épreuve montrent que les souris transgéniques, comme les souris WT, ont une bonne mémoire de la nouvelle cible, à 6 mois et à 12 mois.

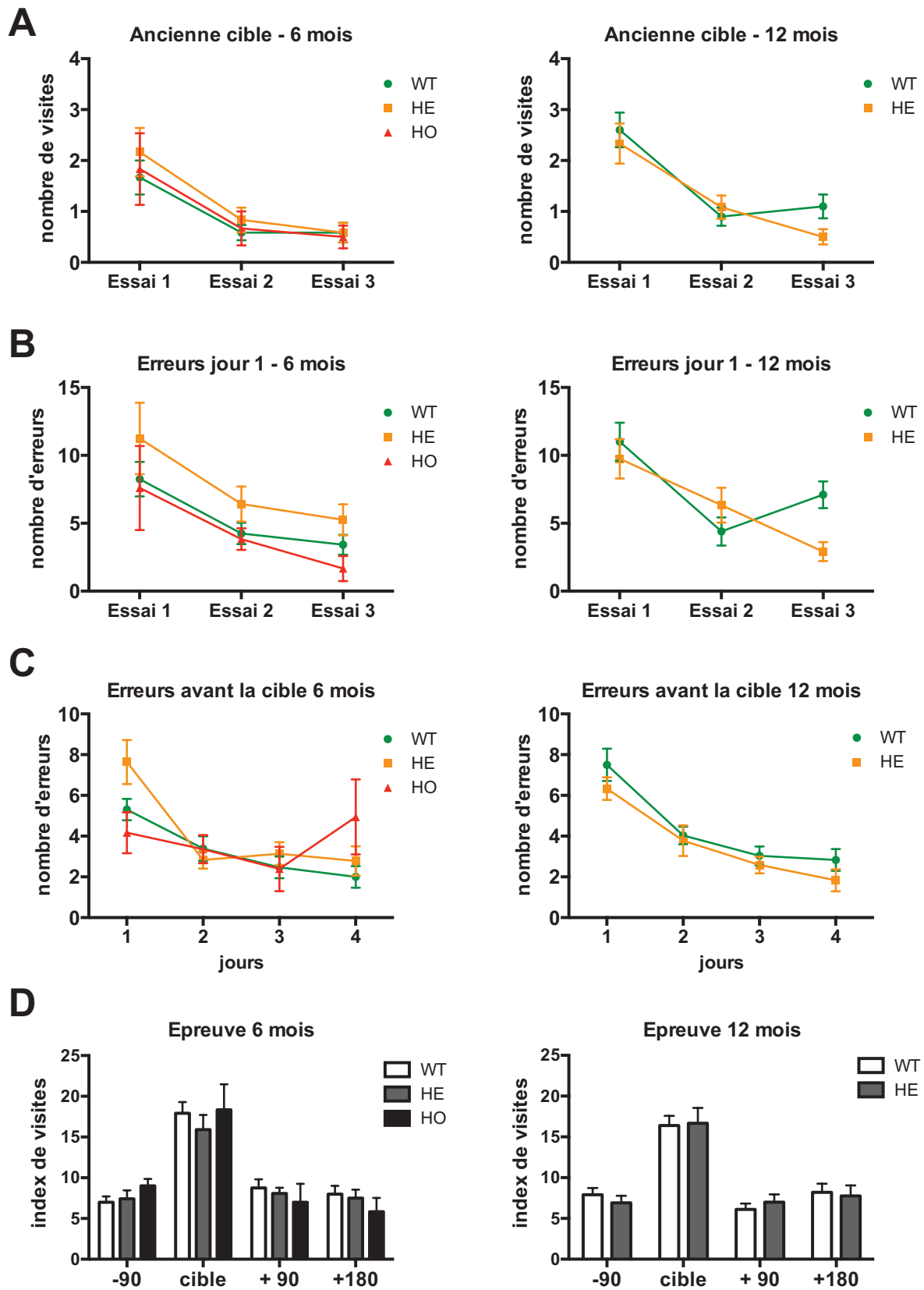


Figure 16 Labyrinthe de Barnes inversé

A. Nombre de visites à l'ancienne cible au cours des trois essais du premier jour B. Nombre de visites avant de visiter la cible au cours des trois essais du premier jour. C. Nombre de visites avant

de visiter la cible au cours des quatre jours d'apprentissage D. Indice des visites lors de l'épreuve, à la cible et à 3 autres trous contrôles. Statistique: anova à deux voies, suivie d'un test de comparaison multiple de tukey entre WT et les autres groupes.

12. Evaluation de l'activité des souris

L'activité des souris dans leur cage a été mesurée de façon continue pendant trois jours. La figure 17 présente les actogrammes des souris à 6 mois et à 12 mois. Les souris WT et HE présentent deux périodes de forte activité: une première période pendant la nuit, à partir de l'extinction des lumières et jusqu'à environ 3h du matin, et une deuxième période, moins intense, juste après l'allumage des lumières, de 7h à 11h du matin. Par contre, les souris HO ont une activité réduite et ont une différence beaucoup moins marquée entre les périodes d'activité et de calme. A 12 mois, les souris HE montrent une plus forte activité que les souris WT à certaines périodes: entre minuit et 3h du matin, c'est à dire à la fin de la première période d'activité, et pendant toute la deuxième période d'activité du matin. Cette hyper activité des souris HE n'est pas visible à 6 mois, ce qui indique qu'elle apparait avec le vieillissement des souris.

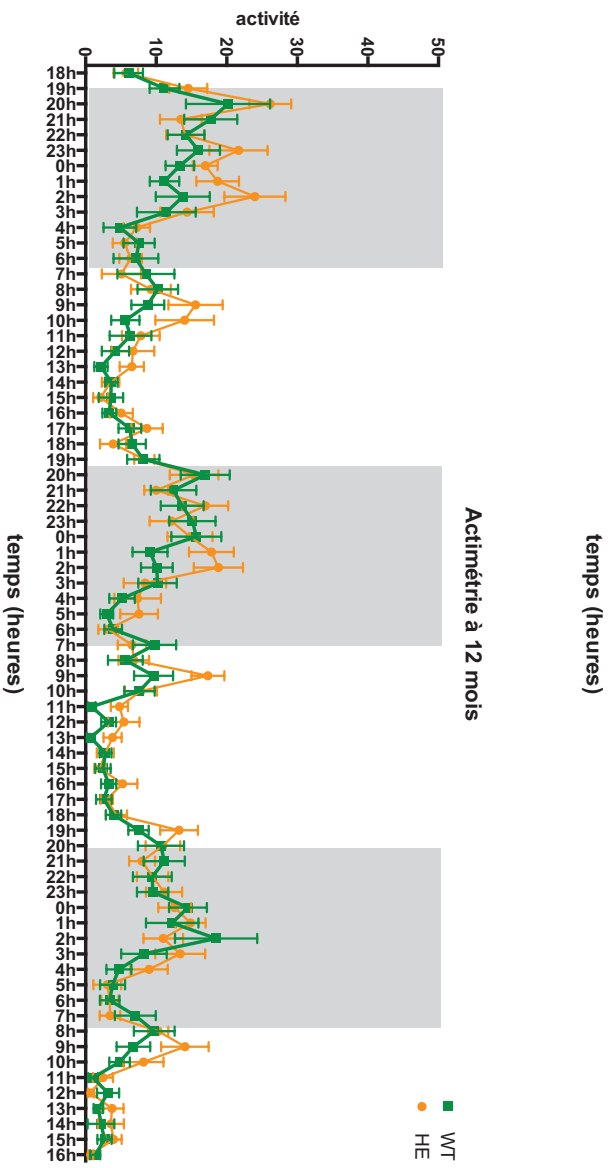


Figure 17 Activité des souris sur trois jours

L'activité des souris a été enregistrée grâce à un appareil d'actimétrie sur trois jours. L'activité représente le nombre d'allers retours moyens sur une heure. Les heures de nuit apparaissent en fond gris sur les graphiques.

III. Publication 2: Full-length PGC-1 α salvages the phenotype of a mouse model of human neuropathy through mitochondrial proliferation.

Des altérations de la fonction mitochondriale sont la cause de nombreuses maladies et sont également impliquées dans des maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer et la SLA. Ces maladies liées à la fonction mitochondriale sont souvent caractérisées par une augmentation du nombre de mitochondries. A ce jour, il n'est pas déterminé si cette augmentation est bénéfique et correspond à un phénomène de compensation, ou si elle est délétère en déséquilibrant des fonctions dépendantes de la mitochondrie, comme le métabolisme du calcium ou la régulation du stress oxydant. Afin de comprendre le rôle de la prolifération mitochondriale dans les mitochondriopathies et ses mécanismes, nous avons étudié un modèle murin de mitochondriopathie présentant une prolifération mitochondriale. Les souris *Cramping* expriment une mutation humaine sur le gène de la chaîne lourde de la dyneine responsable d'amyotrophie spinale chez l'humain. Ces souris présentent des altérations mitochondriales au niveau de leur morphologie, de la respiration cellulaire et de l'expression de gènes du métabolisme énergétique.

Nous avons montré que les souris *Cramping* présentent une augmentation de l'ADN mitochondrial (ADNmt) qui est exacerbée après la prise alimentaire. Cette augmentation est corrélée à une induction post prandiale de deux isoformes de PGC-1 α . L'extinction génique de l'isoforme de PGC-1 α entier (FL-PGC-1 α) annule la prolifération mitochondriale et a un effet délétère pour les souris. L'ablation de FL-PGC-1 α chez les souris *Cramping* exacerbe le dysfonctionnement mitochondrial et induit des altérations motrices.

Cette étude montre un effet bénéfique de la prolifération mitochondriale régulée par PGC-1 α dans un modèle de mitochondriopathie.

Ma participation à cette étude fut la quantification de l'ADNmt et des protéines S6 et S6 phosphorylée.

Full-length PGC-1 α salvages the phenotype of a mouse model of human neuropathy through mitochondrial proliferation

Krisztina Rona-Voros¹, Judith Eschbach¹, Aurélie Vernay^{2,3}, Diana Wiesner¹, Birgit Schwalenstocker¹, Pauline Geniquet⁴, Bénédicte Mousson De Camaret⁴, Andoni Echaniz-Laguna^{2,3,5}, Jean-Philippe Loeffler^{2,3}, Albert C. Ludolph¹, Patrick Weydt¹ and Luc Dupuis^{2,3,*}

¹Department of Neurology, Ulm University, 89081 Ulm, Germany, ²Inserm U1118, 67085 Strasbourg, France, ³Université de Strasbourg, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg (FMTS), UMRS1118, 67085 Strasbourg, France, ⁴Service des Maladies Héréditaires du Métabolisme, Centre de Biologie et de Pathologie Est, CHU Lyon, 69677 Bron, France and ⁵Département de Neurologie, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, 67000 Strasbourg, France

Received June 27, 2013; Revised June 27, 2013; Accepted July 23, 2013

Increased mitochondrial mass, commonly termed mitochondrial proliferation, is frequently observed in many human diseases directly or indirectly involving mitochondrial dysfunction. Mitochondrial proliferation is thought to counterbalance a compromised energy metabolism, yet it might also be detrimental through alterations of mitochondrial regulatory functions such as apoptosis, calcium metabolism or oxidative stress. Here, we show that prominent mitochondrial proliferation occurs in *Cramping* mice, a model of hereditary neuropathy caused by a mutation in the dynein heavy chain gene *Dync1h1*. The mitochondrial proliferation correlates with post-prandial induction of full-length (FL) and N-terminal truncated (NT) isoforms of the transcriptional co-activator PGC-1 α . The selective knock-out of FL-PGC-1 α isoform, preserving expression and function of NT-PGC-1 α , led to a complete reversal of mitochondrial proliferation. Moreover, FL-PGC-1 α ablation potently exacerbated the mitochondrial dysfunction and led to severe weight loss. Finally, FL-PGC-1 α ablation triggered pronounced locomotor dysfunction, tremors and inability to rear in *Cramping* mice. In summary, endogenous FL-PGC-1 α activates mitochondrial proliferation and salvages neurological and metabolic health upon disease. NT-PGC-1 α cannot fulfil this protective action. Activation of this endogenous salvage pathway might thus be a valuable therapeutic target for diseases involving mitochondrial dysfunction.

INTRODUCTION

Mitochondrial dysfunction is an active contributor to many genetic and sporadic neurodegenerative diseases (1). Mutations in components of the mitochondrial respiratory chain lead to a range of severe, early-onset, mitochondrial encephalomyopathies. Mutations in genes involved in mitochondrial trafficking and autophagy in contrast lead to late-onset neurodegenerative diseases, including familial Parkinson's disease and hereditary neuropathies (1).

Increased mitochondrial numbers are commonly observed in tissues from patients with mitochondrial disease (2) and are

usually called 'mitochondrial proliferation', although no actual proliferative mechanism has been demonstrated to date. For instance, abnormal pathology termed 'ragged red fibres' and accumulation of mitochondrial DNA (mtDNA), two proxies of increased mitochondrial numbers are observed in most severely affected muscle fibres of patients with mitochondrial encephalomyopathies (3), but also in diseases indirectly involving mitochondria such as hereditary neuropathies caused by mutations in *OPA1* or *MFN2* (4,5). The increase in mtDNA varies widely between diseases and even between individual patients. For instance, some *MFN2*-mutant patients display increased

*To whom correspondence should be addressed at: INSERM U1118, Faculté de Médecine, 11 rue Humann, 67085 Strasbourg, France. Tel: +33 368853082; Fax: +33 368853065; Email: ldupuis@unistra.fr

mtDNA in blood cells (5) while others, more severely affected, show on the contrary mtDNA depletion (6).

Mitochondrial proliferation is usually considered a compensatory mechanism mitigating the phenotype of the affected tissues (2). Consistent with this view, muscle overexpression of the full-length (FL) isoform of the transcriptional co-activator PGC-1 α , leading to massive mitochondrial proliferation, is broadly protective for muscle function in mitochondrial myopathies (7,8), but also in late-onset neurodegenerative diseases affecting mitochondria such as amyotrophic lateral sclerosis (9). Mitochondrial proliferation can also worsen the phenotype by interfering with mitochondrial-dependent processes, including calcium metabolism, cell survival or increasing oxidative stress. Indeed, mitochondrial proliferation is associated with apoptotic features in muscle fibres (10) and forced mitochondrial biogenesis leads to muscle atrophy and dilated cardiomyopathy (11,12). Finally, increasing mtDNA through transgenic overexpression of Twinkle and Tfam, two factors that regulate mtDNA replication was deleterious for respiratory chain activities (13). In all, it remains unresolved whether the net effect of mitochondrial proliferation is beneficial or deleterious. Mechanisms underlying mitochondrial proliferation are also unknown. Both increased mitochondrial biogenesis (14) and decreased mitochondrial autophagy (15) are sufficient to increase mitochondrial mass, yet whether one of these mechanisms, or both, is necessary to elicit mitochondrial proliferation in disease conditions remains unknown.

To investigate mitochondrial proliferation and its mechanisms in animal models, it is mandatory to (i) interrogate a mammalian *in vivo* model system displaying mitochondrial proliferation, (ii) identify the molecular mechanisms responsible for this mitochondrial proliferation and (iii) perform loss-of-function experiments to ablate mitochondrial proliferation and study the pathogenic consequences. Most commonly used models of mitochondrial diseases such as mutator or deleter mice do not show increased mtDNA copies, but rather depleted mtDNA (8,16). Recently, we showed that the *Cramping* mutation in the *Dync1h1* gene encoding the heavy chain of dynein, a molecular motor involved in mitochondrial trafficking (17), leads to systemic mitochondrial dysfunction with ragged red fibres (18). *DYNC1H1* mutations in humans cause inherited motor neuropathies (19,20) similar to *MFN2* neuropathies. Interestingly, the mitochondrial phenotype was much more profound *in vitro*, with strongly fragmented mitochondria, compared with the *in vivo* situation raising the possibility that compensatory mitochondrial proliferation partially rescues the phenotype *in vivo*. Here, we show that *Cramping* mice display systemic mitochondrial proliferation. This occurs through the FL isoform of the transcriptional co-activator PGC-1 α and mitigates the metabolic and neurological phenotype.

RESULTS

Increased mtDNA levels in *Cramping* mice

We previously observed decreased mitochondrial respiration in white adipose tissue and skeletal muscles along with increased mitochondrial area in muscle of *Cramping* mice (18). The mechanisms underlying mitochondrial dysfunction are unknown and we hypothesized that decreased quality and/or quantity of

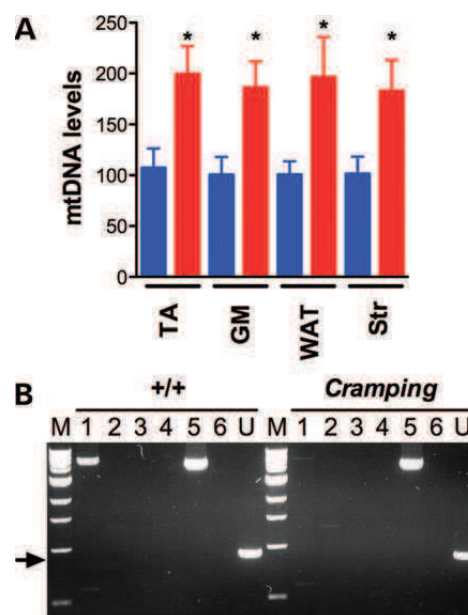


Figure 1. Increased mitochondrial DNA levels in *Cramping* mice. +/+ mice are in blue columns, *Cramping* mice are in red columns. (A) Mitochondrial DNA (mtDNA) levels in TA gastrocnemius (GM) muscles, WAT and striatum. * $P < 0.05$, Student's *t*-test when compared with corresponding +/+. $n = 5-12$ per group. (B) Long-range PCR in the WAT of +/+ or *Cramping* mice. Lane U: primer pair used as an internal control to amplify a 926-bp fragment of wild-type (wt) mtDNA in a region not usually deleted. Lanes 1-6: primer pairs used for the detection of mtDNA deletions which usually span in the major region between the two replication origins. M is a 1-kb size marker. The 926 bp fragment is indicated by the arrow. Note that no multiple mtDNA deletions were observed in lanes 1-6.

mtDNA may be involved. To test this, we first measured mtDNA copy number using qPCR and found increased, and not decreased, mtDNA levels in tibialis anterior (TA) muscle, gastrocnemius muscle, white adipose tissue (WAT) and striatum of *Cramping* mice (Fig. 1A). We did not observe large-scale deletions of mtDNA using long-range PCR (Fig. 1B), suggesting that the mtDNA maintenance is functional. Interestingly, this compensatory response was not observed in cultured embryonic striatal neurons or fibroblasts, even in homozygous *Cramping* cells (Supplementary Material, Fig. S1), suggesting that it was not cell-autonomous. Thus, mtDNA copy number is increased *in vivo* in *Cramping* mice as a possible compensatory response.

PGC-1 α activation in *Cramping* muscles

We observed that mtDNA levels in *Cramping* mice were correlated with nutritional cues. Indeed, overnight fasting followed by 6 h of re-feeding potentially increased mtDNA levels in *Cramping* muscles (Fig. 2A). A candidate mechanism mediating increased mtDNA copy number in *Cramping* mice is PGC-1 α activation (21), a transcriptional co-activator regulating multiple cellular functions in particular mitochondrial biogenesis. PGC-1 α exists in multiple isoforms, that fall into three major families: FL isoforms that are canonical isoforms including PGC-1 α 1, N-terminal truncated (NT) isoforms that include the recently described NT-PGC-1 α and PGC-1 α 4, and internally truncated (IT) isoforms, such as PGC-1 α 2 and 3, that do not include

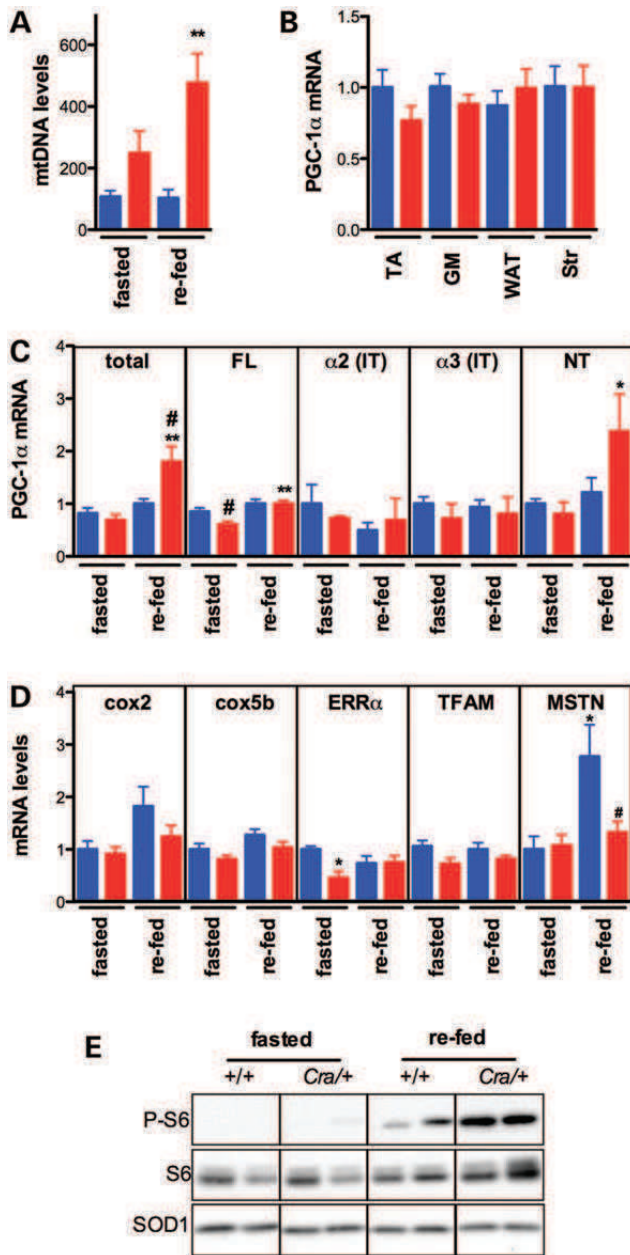
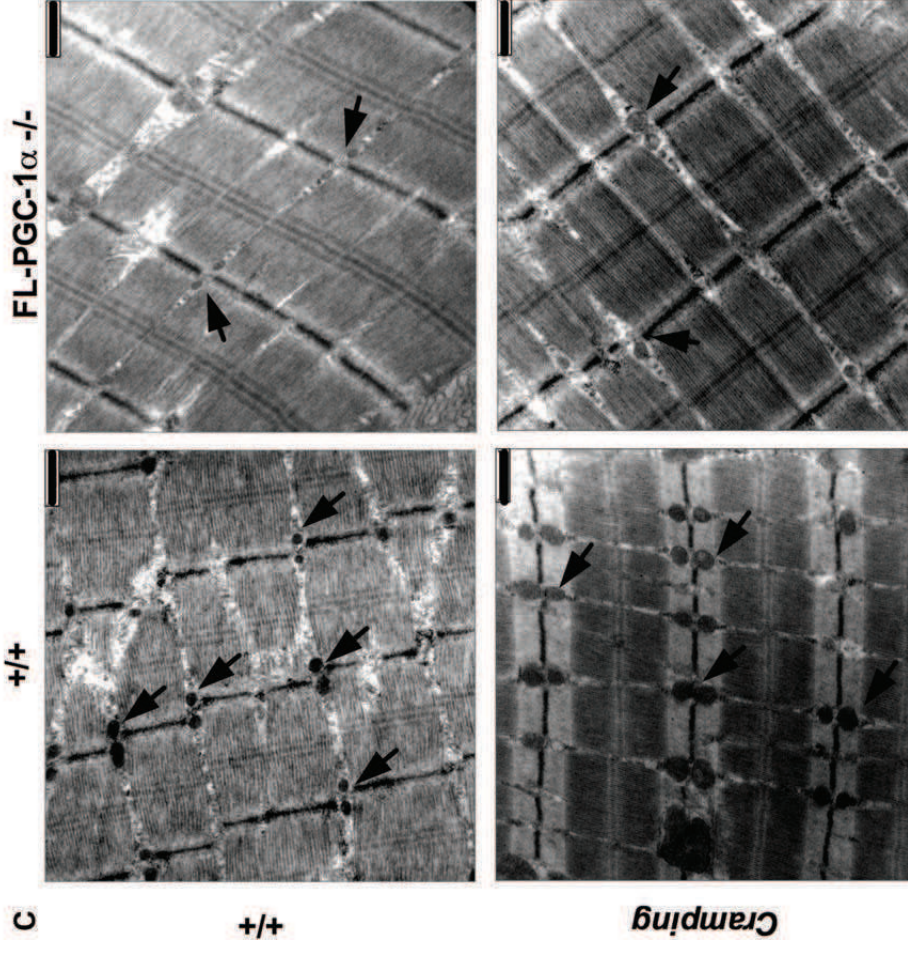
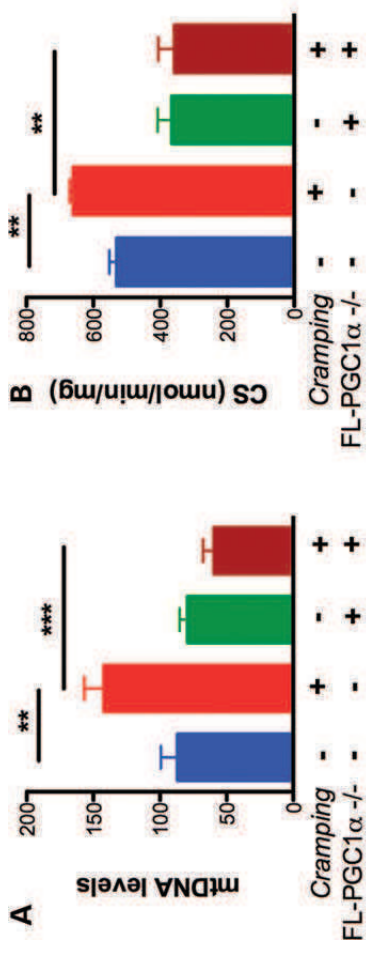


Figure 2. Transcriptional activation of PGC-1 α isoforms in *Cramping* mice. +/+ mice are in blue columns, *Cramping* mice in red columns. (A) mtDNA levels in gastrocnemius muscle of after 16 h of fasting (fasted) or 16 h of fasting followed by 6 h of re-feeding (re-fed). (B) mRNA levels of total PGC-1 α in tibialis anterior (TA), gastrocnemius (GM), white adipose tissue (WAT) and striatum (Str). (C and D) mRNA levels of total and FL (a.k.a. including the canonical PGC-1 α 1), IT (including PGC-1 α 2 and 3) and NT (including PGC-1 α 4) isoforms of PGC-1 α (B) and some of their targets (C) in gastrocnemius muscle after 16 h of fasting (fasted) or 16 h of fasting followed by 6 h of re-feeding (re-fed). * $P < 0.05$ versus corresponding +/+, ** $P < 0.01$, versus corresponding +/+, # $P < 0.05$ versus corresponding dietary treatment. $n = 5$ per group. (E) Representative western blotting of phosphorylated S6 (upper panel), total S6 (middle panel) and SOD1 (lower panel) as loading control after 16 h of fasting (fasted) or 16 h of fasting followed by 6 h of re-feeding (re-fed). Two representative mice per condition are shown on a total of 5 mice per condition.

exons 3–5 (22–24). Expression of total PGC-1 α was roughly unchanged in gastrocnemius and TA muscles as well as in striatum of *Cramping* mice (Fig. 2B). PGC-1 α is transcriptionally and post-translationally regulated by multiple mechanisms, in particular by nutritional cues and exercise (21). Upon overnight fasting, levels of total PGC-1 α mRNA were unchanged in gastrocnemius muscles of both wild-type mice and *Cramping* mice (Fig. 2C). Upon re-feeding, levels of total PGC-1 α mRNA were increased in *Cramping* mice but not in wild-type littermates (Fig. 2C), and this increase was due to FL- and NT isoforms (Fig. 2C). The alternatively spliced IT isoforms PGC-1 α 2 and 3 were unaffected. PGC-1 α induction is able to promote mitochondrial biogenesis through induction of multiple genes. Intriguingly, the expression of most of the canonical targets of PGC-1 α that we tested, including cytochrome oxidase subunits or TFAM, was unchanged in *Cramping* muscles, either upon fasting or re-feeding conditions (Fig. 2D). ERR α , a target of both FL- and NT-PGC-1 α , was downregulated in *Cramping* muscle upon fasting, but returned to normal levels upon re-feeding, i.e. when PGC-1 α was upregulated. IGF-1, an exclusive NT-PGC-1 α target, was unchanged while myostatin, a negative NT-PGC-1 α target was decreased in re-fed *Cramping* muscles when compared with re-fed littermates (Fig. 2D). We also did not observe changes in the expression of *Tfeb*, a master regulator of lysosomal biogenesis, which is a PGC-1 α target (25) or of genes directly involved in mtDNA replication such as *Polg* or *Peo1* (data not shown). As expected upon increased activity of PGC-1 α 4, the major muscle NT isoform, *Cramping* muscles, displayed higher phosphorylation of the mTOR target S6 (Fig. 2E). Thus, mitochondrial proliferation in *Cramping* mice correlates with transcriptional induction of both FL- and NT-PGC-1 α .

Mitochondrial proliferation in *Cramping* mice is dependent on endogenous FL-PGC-1 α

Our previous findings correlated expression levels of PGC-1 α isoforms with mitochondrial proliferation but did not mechanistically relate PGC-1 α and mitochondrial proliferation. In order to address this question, we chose to ablate PGC-1 α in *Cramping* mice. However, PGC-1 α has pleiotropic roles in muscle physiology, and pan-PGC-1 α ablation is very toxic *per se* for muscle physiology (26). Interestingly, the different PGC-1 α functions are at least partially segregated among the different isoforms with FL-PGC-1 α being more specialized in increasing mitochondrial biogenesis, and NT-PGC-1 α being more involved in muscle anabolism (22). For these reasons, we sought to restrict our functional studies to FL-PGC-1 α . Two PGC-1 α knock-out mice have been generated and characterized (27,28). Knock-out mice from Lin and collaborators display ablation of exons 3–5. Since exon 3 is present in all known PGC-1 α isoforms, these mice are bona fide complete PGC-1 α knock-out mice (22,27). Contrasting with this, PGC-1 α knock-out mice from Leone *et al.* display a targeted insertion/deletion between exon 5 and 6 of the PGC-1 α gene (28). This is expected to lead to an out-of-frame mRNA for all isoforms comprising exons 5 and 6, i.e. all FL- and NT isoforms while preserving all IT



isoforms (Supplementary Material, Fig. S2). The functional consequences of this insertion are however not similar for FL- and NT isoforms: the NT isoforms are only truncated for the 16 C-terminal amino-acids, leading to a roughly preserved function (29). In skeletal muscle, RT-qPCR experiments confirmed the complete ablation of FL isoforms, preservation of IT isoforms and truncation of NT isoforms (Supplementary Material, Fig. S3A). Consistent with FL-PGC-1 α ablation, mice from Leone *et al.* displayed decreased expression of canonical PGC-1 α targets, but had preserved expression of targets exclusive to NT-PGC-1 α , such as myostatin or IGF-1 in skeletal muscle (Supplementary Material, Fig. S3B). Thus, mice from Leone *et al.* constitute a valid tool to investigate the function of FL-PGC-1 α separately from NT and IT isoforms. These mice will thus be termed as FL-PGC-1 α $-/-$ mice in the rest of this report.

To evaluate whether FL isoforms were functionally involved in *Cramping*-induced mitochondrial proliferation, we crossed FL-PGC-1 α $-/-$ mice with *Cramping* mice to generate *Cramping* mice deficient in FL-PGC-1 α (termed *Cra/FL α $-/-$* mice in the rest of this report). The ablation of FL-PGC-1 α in *Cramping* mice completely abolished the previously observed increases in mtDNA levels in muscles (Fig. 3A). At 6 months of age, i.e. an age at which mitochondrial dysfunction is not histologically and biochemically evident in *Cramping* mice, we observed a 20% increase in citrate synthase activity *Cramping* muscle, which was fully reverted by FL-PGC-1 α ablation (Fig. 3B). This was associated with unchanged mitochondrial respiratory complex activities and normal ratios between respiratory chain complex activities (Supplementary Material, Table S1) suggesting that mitochondrial proliferation maintained close to normal respiratory activity at that age. From an ultrastructural point of view, the *Cramping* mutation leads to giant mitochondria invading sarcomeres (18). FL-PGC-1 α deficiency reverted this mitochondrial proliferation (Fig. 3C, quantifications in D and E). Thus, mitochondrial proliferation in *Cramping* mice is fully dependent upon endogenous FL-PGC-1 α and cannot be rescued by the roughly normal expression of NT-PGC-1 α in FL-PGC-1 α $-/-$ mice.

Endogenous FL-PGC-1 α mitigates overall phenotype and mitochondrial dysfunction in *Cramping* mice

We next asked whether ablating the increase in mitochondrial proliferation in *Cramping* mice, through FL-PGC-1 α ablation, modified the phenotype of the mice. *Cra/FL α $-/-$* mice displayed a much more severe phenotype than single mutations. They showed prominent kyphosis and abnormal posture as well as progressive hair loss (Fig. 4A). Both male and female *Cra/FL α $-/-$*

mice displayed body weight loss when compared with the three other genotypes (Fig. 4B and C). Body temperature of *Cra/FL α $-/-$* mice became progressively lower in females (Fig. 4D and E) while in males the defect was also present in single FL-PGC-1 α $-/-$ mice. At 12 months of age, both single *Cramping* and FL-PGC-1 α $-/-$ muscles showed the expected decrease in succinate dehydrogenase activity (SDH) activity in both TA and soleus muscles (Fig. 5). The combination of both mutations potently exacerbated this mitochondrial defect (Fig. 5). We however did not detect large-scale deletions in mtDNA in muscle or striatum of any genotype (Supplementary Material, Fig. S4).

Endogenous FL-PGC-1 α mitigates the neurological phenotype of *Cramping* mice

The *Cramping* mutation leads to a stereotypical neurological phenotype that includes loss of muscle strength and incoordination (30). When compared with *Cramping* mice, *Cra/FL α $-/-$* mice showed an earlier and stronger loss of grip strength in forelimbs and all limbs (Fig. 6A and B). Tremor, a phenotype occasionally observed in *Cramping* or FL-PGC-1 α $-/-$ mice after 9 months of age, occurred systematically before 6 months of age in *Cra/FL α $-/-$* mice (Fig. 6C). Indeed, compound transgenic mice were unable to hang on a string as early as 4 months of age, while *Cramping* mice were still able to do so at least 10 s until 9 months of age (Fig. 6D). Further supporting this point, compound transgenic mice showed profoundly impaired rotarod performance when compared with all three other genotypes at 6, 9 and 12 months of age (Fig. 6E) and decreased rearing activity at 8 and 12 months of age (Fig. 6F).

DISCUSSION

We show here that FL PGC-1 α is absolutely required for mitochondrial proliferation occurring during mitochondriopathy and that its ablation strongly exacerbates metabolic and neurological phenotype in mice.

Increased number of (abnormal) mitochondria in muscle is a hallmark of human mitochondrial diseases, although the underlying mechanisms are unclear. This situation of mitochondrial proliferation is observed in a subset of patients with neuropathies similar to *DYNC1H1* mutations, notably due to *MFN2* or *OPA1* mutations (4,5). Here, we observed mitochondrial proliferation, including increased mtDNA copy numbers *in vivo*, but not *in vitro* along with increased citrate synthase activity and increased mitochondrial area in muscle. This shows that, similar to the situation in many patients with mitochondrial

Figure 3. Mitochondrial proliferation in *Cramping* mice is dependent upon FL-PGC-1 α . $+/+$ mice are in blue, *Cramping* mice are in red, FL-PGC-1 α $-/-$ is in green and compound *Cra/FL α $-/-$* is in brown. (A) Mitochondrial DNA (mtDNA) levels in tibialis anterior muscle. $**P < 0.01$, $***P < 0.001$, ANOVA followed by Newman–Keuls when compared with the indicated condition. $n = 8$ per group. (B) Citrate synthase activity in nmol/min/mg protein in gastrocnemius muscles. $**P < 0.01$, $***P < 0.001$, ANOVA followed by Newman–Keuls when compared with the indicated condition. $n = 3$ per group. (C) Representative electron micrographs of glycolytic gastrocnemius muscle of $+/+$ (left column) and *Cramping* (right column) mice in either FL-PGC-1 α $+/+$ (upper row) or $-/-$ (lower row) background. Pairs of mitochondria are found in the I-band on both sides of the Z-band in wild-type mice. Note the large increase in size in the mitochondria of *Cramping* mice disrupting the alignment of sarcomeres, that is reverted by ablation of PGC-1 α . As previously observed, mitochondria of FL-PGC-1 α $-/-$ mice are smaller. Arrows show pairs of mitochondria in each picture. Scale bar: 600 nm. (D and E) quantification of mitochondrial area (D) and perimeter in experiments presented in (C).

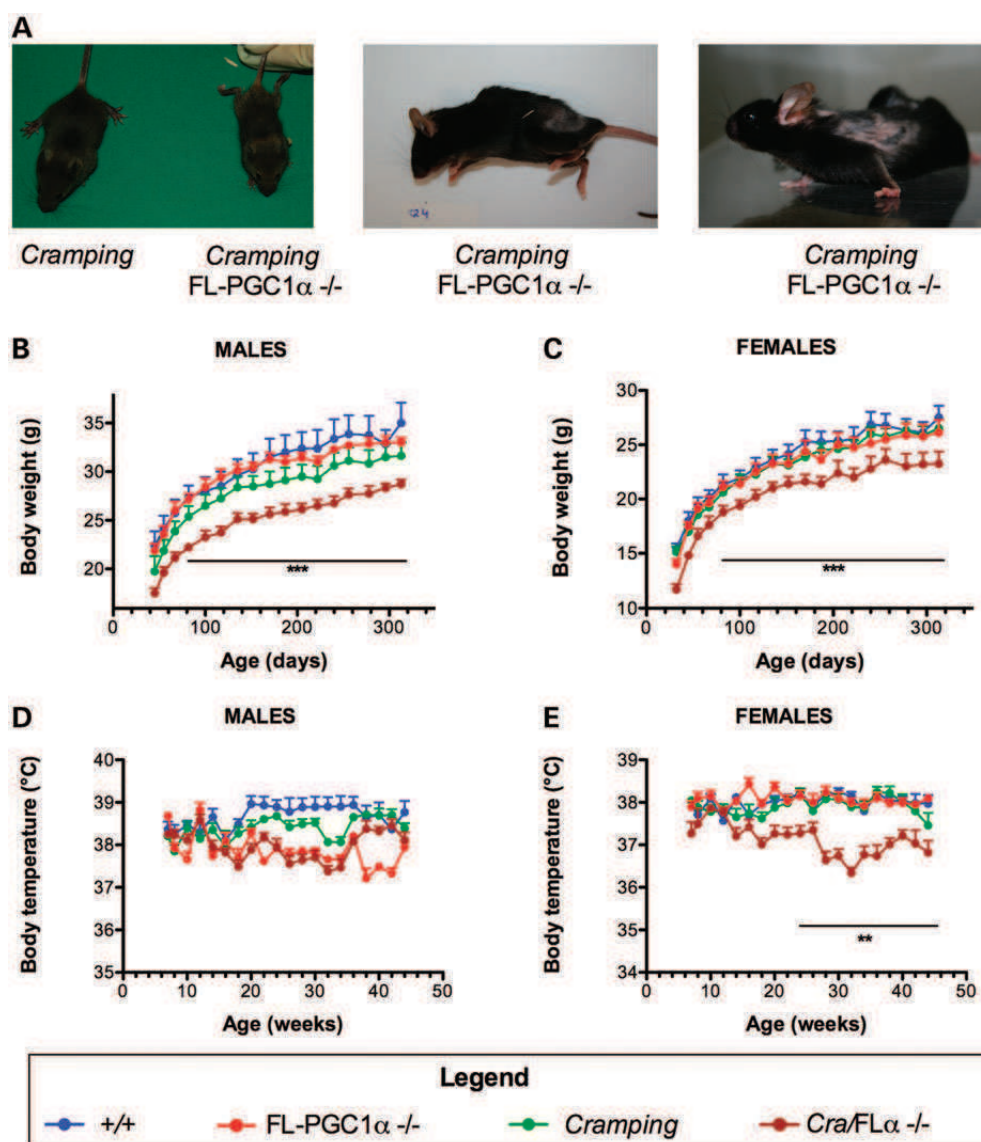


Figure 4. FL-PGC-1 α ablation exacerbates global phenotype of *Cramping* mice. +/+ mice are in blue, *Cramping* mice in red, FL-PGC-1 α -/- in green and compound *Cra/FL α* -/- in brown. (A) Left: representative photographs of 3-week-old littermate *Cramping* and *Cra/FL α* -/- mice. Right: typical kyphosis and hair loss in a 12-month-old *Cra/FL α* -/- mouse. Body weight (B and C) and body temperature (D and E) of male (B and D) and female (C and E) mice. *** $P < 0.01$ for *Cra/FL α* -/- when compared with the three other groups. *** $P < 0.001$ for *Cra/FL α* -/- when compared with the three other groups. $N = 7-8$ per gender per group.

disease, mitochondrial proliferation occurred in *Cramping* mice. This event could either allow some maintenance of mitochondrial energy metabolism to counteract the progressive mitochondrial dysfunction installing in these mice (18) or be detrimental and alter signalling pathways. A candidate mechanism underlying mitochondrial proliferation in *Cramping* mice was PGC-1 α activation (21,31). Consistent with PGC-1 α involvement, expression of both FL and NT isoforms of PGC-1 α increased after re-feeding, and correlated with mtDNA accumulation. At this point of the studies, both FL- and NT-PGC-1 α involvement could be hypothesized, and evidence was only correlations between mtDNA levels and PGC-1 α expression. The widely documented function of FL-PGC-1 α in mitochondrial physiology led us to focus on this specific isoform as a

potential key player in mitochondrial proliferation. Definitive evidence of FL-PGC-1 α involvement was provided by a complete reversal of several indices of mitochondrial proliferation upon FL-PGC-1 α ablation in *Cramping* mice. Importantly, in our FL-PGC-1 α mice, NT isoforms are functionally preserved, as shown previously by others (29) and here in skeletal muscle. Thus, NT isoforms are not sufficient to substitute for FL isoforms and induce mitochondrial proliferation during disease. This function present in FL isoforms but not in NT isoforms might be due to differences in nuclear import. Indeed, NT isoforms accumulate in the cytoplasm, whereas FL isoforms are exclusively nuclear (32,33). It is thus possible that a constitutive nuclear presence is necessary for PGC-1 α to trigger mitochondrial proliferation. Alternatively, the domains of FL-PGC-1 α

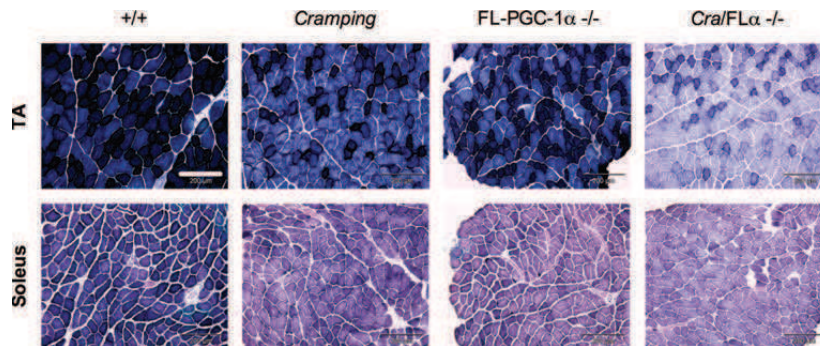


Figure 5. FL-PGC-1 α ablation exacerbates mitochondrial dysfunction in *Cramping* mice. Representative photomicrographs showing muscle sections of +/+, *Cramping*, PGC-1 α 1/4 -/- and compound *Cra*/FL α -/- tibialis anterior (upper pictures) and soleus muscles from 12-month-old mice stained for SDH. Scale bar: 200 μ m. $n = 4-5$ per group.

not present in NT isoforms include many interaction sites with important transcription factors such as peroxisome proliferator-activated receptors, FoxO1 or MEFC2 (24). Each of these factors might be critical in this mitochondrial proliferation function. Finally, it is also possible that posttranscriptional mechanisms required for triggering mitochondrial proliferation target domains exclusively present in FL isoforms. One candidate mechanism would be FL-PGC-1 α phosphorylation by the mTOR/S6kinase pathway. Indeed, mTOR/S6kinase pathway phosphorylates PGC-1 α on a domain present only in FL isoforms and orientate its function towards mitochondrial biogenesis (34). Consistent with an involvement of this pathway, we observed more activity of S6 kinase in *Cramping* mice upon re-feeding as shown by increased phosphorylation of S6. Moreover, the PGC-1 α /mTOR complex has already been extensively involved in mitochondrial biogenesis (35–38). We would thus like to speculate that FL PGC-1 α and mTOR orchestrate a coordinated response to mitochondrial dysfunction, occurring in specific nutritional states. Whether mTOR, S6 kinase and/or its associated factors such as YY1 are actually involved in mitochondrial proliferation will require further investigations. In all, our study shows that FL-PGC-1 α is *necessary* for mitochondrial proliferation, while NT-PGC-1 α is not *sufficient*. NT-PGC-1 α , although not sufficient, could however be *necessary* for mitochondrial proliferation, and answering this question will require specific knock-out mice that are currently not available.

Intriguingly, PGC-1 α upregulation after re-feeding, although associated with strong increases in mtDNA copy numbers, was not correlated with systematic increases of its known transcriptional targets. This uncoupling of PGC-1 α transcription and mtDNA levels from transcriptional targets might be due a transient effect of PGC-1 α on the transcription of its targets, but also to a function of PGC-1 α independent from transcriptional co-activation. Indeed, PGC-1 α partially resides to the mitochondria and binds to mtDNA through mitochondrial transcription factor A (39,40), suggesting that it could be involved in mitochondrial transcription and/or mtDNA replication.

The loss of FL-PGC-1 α , and subsequent loss of mitochondrial proliferation, strongly exacerbated the previously observed abnormalities of *Cramping* mice, either metabolic (muscle mitochondrial function) or neurological (grip strength, rotarod, tremors). New defects appeared in compound transgenic mice that were absent in single transgenic mice, in particular a

pronounced kyphosis, an inability to rear, profound hair loss and weight loss. The respective mechanisms underlying these different phenotypes remain unknown, in particular whether they are the consequences of worsened mitochondrial dysfunction. We also observed the appearance of gender differences, in particular with decreased body temperature in female mice. We previously observed decreased rectal temperature in aged male *Cramping* mice (41). This difference in basal body temperature is also observed in the current study when considering only aged males (data not shown), although the difference is smaller than previously reported. Several differences might explain this discrepancy, in particular the use of different detection method (subcutaneous temperature chips in this study, rectal probe previously). Also, the genetic background of the mice was different from our previous study due to cross breedings. Whatever the reason for the difference between both studies, ablation of FL-PGC-1 α was on its own sufficient to lead to hypothermia in male mice, while addition of a *Cramping* allele was necessary to lead to hypothermia in female mice. This reinforces the notion that dynein and FL-PGC-1 α are both necessary for thermogenesis in mice (27,41,42), and illustrates the higher basal thermogenic capacity in female rodents when compared with males (43) as well as the gender-dependent effects of FL-PGC-1 α we previously observed in another mouse model of neurodegeneration (44). The underlying mechanisms for impaired thermogenesis will require further investigation, in particular to determine whether this is due to impaired mitochondrial function and/or impaired beta-adrenergic signalling.

Our cross breeding results indicate that the mitochondrial proliferation elicited by FL-PGC-1 α increased activity is able to mitigate the phenotype of *Cramping* mice. This is in line with the gain-of-function experiments showing that the transgenic overexpression of FL-PGC-1 α is able to mitigate symptoms of mitochondrial diseases in a tissue-specific manner (7,8,45,46). That endogenous mechanisms are able to elicit similar effects might provide potential therapeutic targets for mitochondrial diseases eliminating the need for viral overexpression. Such an approach has already been tested with bezafibrate, a pan-PPAR agonist able to increase PGC-1 α activity (7), but the mechanisms involved have recently been challenged (16,47). The elucidation of the mechanisms underlying re-feeding induced increase in mtDNA might provide alternative targets. This pathway might also be of high interest for other diseases in

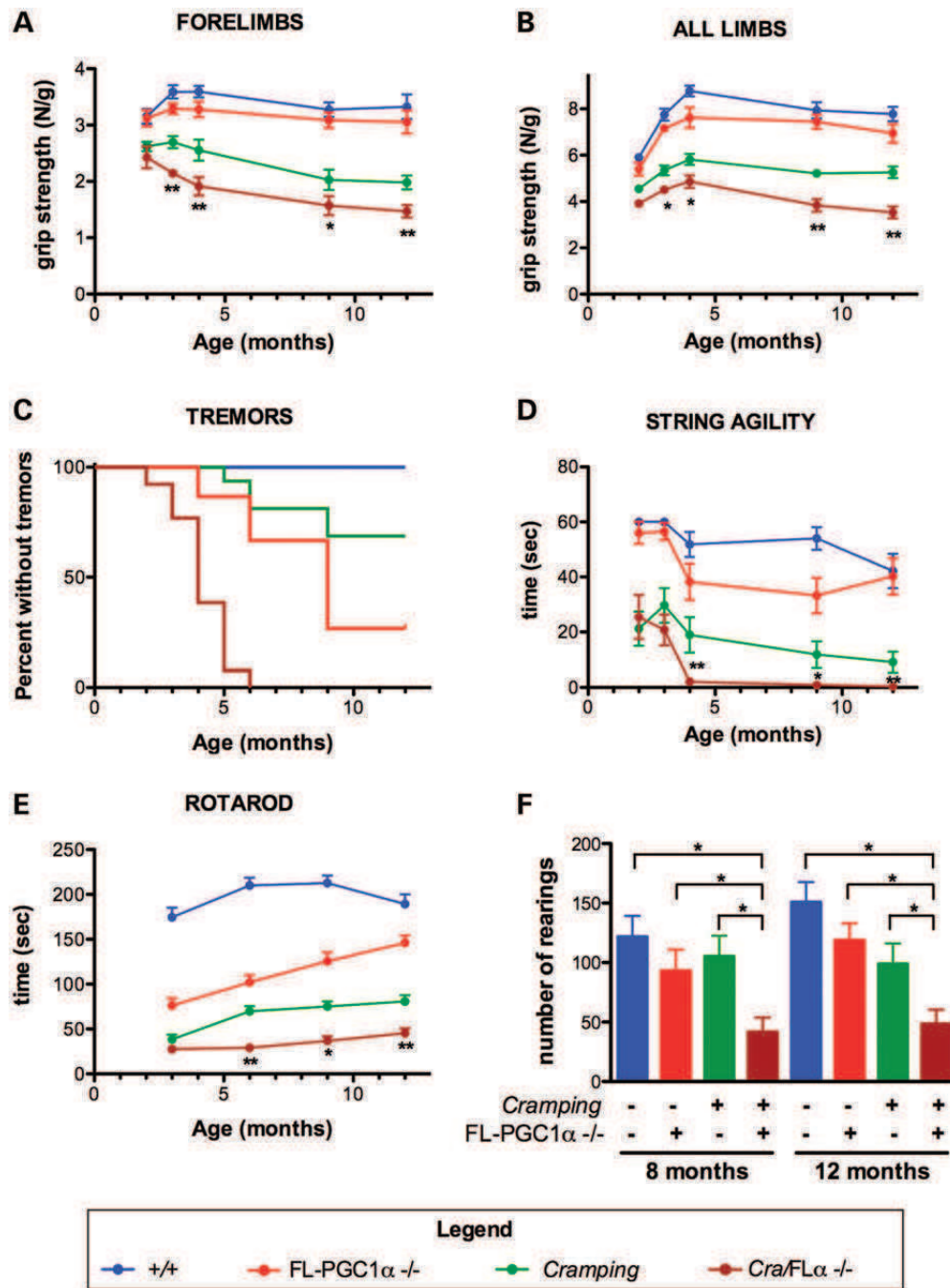


Figure 6. FL-PGC-1 α ablation exacerbates neurological phenotype of *Cramping* mice. +/+ mice are in blue, *Cramping* mice in red, FL-PGC-1 α ^{-/-} in green and compound *Cra/FL α ^{-/-}* in brown. Forelimb (A) and all limb (B) grip strength. ** $P < 0.01$ for *Cra/FL α ^{-/-}* when compared with *Cramping* mice (repeated ANOVA). $n = 14-16$ per group. (C) Kaplan–Meier plot depicting the onset of tremors. $P < 0.001$ for *Cra/FL α ^{-/-}* when compared with all three other groups (log-rank test). $n = 14-16$ per group. String agility score (in s) (D) and rotarod performance (E). ** $P < 0.01$ for *Cra/FL α ^{-/-}* when compared with *Cramping* mice (repeated ANOVA). $n = 14-16$ per group. (F) Number of rearings in a 30-min open field test for mice at 8 or 12 months of age. * $P < 0.05$ for *Cra/FL α ^{-/-}* when compared with the indicated condition (ANOVA followed by Newman–Keuls). $n = 7-8$ per group.

which PGC-1 α modulates the disease process. This is especially the case for Huntington’s disease and amyotrophic lateral sclerosis in which we recently showed a modifier function of the *PPARGC1A* gene (44,48).

In all, we identify here that the FL PGC-1 α isoform is required for disease-induced mitochondrial proliferation and cannot be substituted by its NT isoforms. We also show the protective potential of this isoform against mitochondrial dysfunction, but

also against more distal, likely indirect, phenotypes such as neurodegeneration.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Heterozygous male *Cramping* mice (Ingenium Pharmaceuticals AG, Martinsried, Germany) used were genotyped as described previously (49). Wild-type littermates were used as controls. The FL-PGC-1 α $-/-$ mice obtained from Kelly (28) were initially published as FL-PGC-1 α $-/-$ mice but our current results and those of others (29) show that these mice are only ablated for FL-PGC-1 α (see section Results and Discussion). We created *Cramping* FL-PGC-1 α $-/-$ (referred as *Cra/FL α $-/-$*) mice in two crossing steps and used F1-generation mice of the four genotypes in the same B6C3He-hybrid background. Mice were maintained in a temperature- and humidity-controlled environment at 23°C with a 12-h light/dark cycle and had food and water *ad libitum*. For biochemical analysis, animals were sacrificed and tissues were quickly dissected, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until use. All animal experiments were performed under the supervision of authorized investigators and followed current EU regulations. These animal experiments were approved by the regional Ethical Committee of Baden-Württemberg under number 990.

mtDNA quantification

Total DNA was extracted from muscle using standard methods. The content of mtDNA was determined using real-time quantitative PCR using 100 ng of purified DNA by measuring the threshold cycle ratio (ΔCt) of a mitochondrial-encoded gene *Cox1* versus the nuclear-encoded gene *Ppia* (cyclophilin A).

RT-qPCR

Frozen tissues were placed into tubes containing a 5-mm stainless steel bead (Qiagen, Hilden, Germany) and 1 ml of Trizol reagent (Invitrogen, Paisley, UK) and homogenized using a TissueLyser (Qiagen, Hilden, Germany) at 30 Hz for 3 min. RT and PCR assays were performed using the Bio-Rad (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France) iCycler kits and protocols of the manufacturer on a Bio-Rad CFX96 qPCR. Primer sequences are provided in Supplementary Material, Table S2.

Western blotting

Tissues were homogenized in protein extraction buffer containing 250 mM sucrose, 1 mM EDTA, 2% SDS, 1 mM DTT, 10 mM Tris-HCl, 0.01% protease inhibitor cocktail and 0.01% phosphatase inhibitor cocktails (Sigma, Sigma-Aldrich, Lyon, France). Protein quantification was carried out using a BCA Assay Kit (Interchim, Montluçon, France). Equal amounts of soluble proteins were denatured by boiling, resolved by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to a nitrocellulose membrane. After using a chemiluminescent blocker (Millipore, Billerica, MA, USA), membranes were probed with primary antibodies (anti-S6 Ribosomal Protein (54D2) Mouse mAb #2317 Cell Signaling,

anti-Phospho-S6 Ribosomal Protein (Ser240/244) Antibody #2215 Cell Signaling, anti-SOD1: 574597, Merck, Darmstadt, Germany) and secondary antibodies (anti-rabbit HRP: BI2407, P.A.R.I.S, Compiègne, France; anti-sheep HRP: 713-035-174, Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK). To ensure that equal amounts of protein were loaded, SOD1 immunoreactivity was used rather than tubulin or actin. Indeed, these two latter proteins showed decreased levels in homozygous *Cra/Cra* MEFs precluding them to be used as loading controls in studies involving *Cramping* animals. The protein bands were detected by chemiluminescence using an ECL Lumina Forte (Millipore) and a chemiluminescence detector (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Histological techniques

For muscle histology, isopentane frozen samples were cut on a cryostat into slices 16 μm thick and processed for SDH staining using standard pathological stainings. For electron microscopy (EM) analysis, 12-month-old mice were sacrificed and muscle tissues were quickly dissected and fixed with 2.5% glutaraldehyde, 10% sucrose fixative. Samples were postfixed, dehydrated, embedded in Epon, and sectioned for EM. EM was performed at the Central Electron Microscopy Department at the University of Ulm.

Measurement of body temperature

Body temperature was monitored three times every week from the age of 6 weeks as described previously (50) at noon with a telemetry system using subcutaneously implanted transponders placed in the interscapular space (Bio Medic Data Systems, Seaford, DE, USA).

Testing of motor performance and behaviour

Motor performance and behaviour tests were performed as described previously (30) with slight modifications. One week before the start of the tests, animals were brought to the behavioural analysis facility; single caged and handled every day. Only male mice were used for behavioural tests. Modified SHIRPA protocol was performed longitudinally from 2 to 12 months of age to detect the overall neurological phenotype of the mice. Muscle grip strength was measured using a Bioseb gripmeter (Vitrolles, France) on forelimbs and all limbs. Each assay was performed in triplicate and measurements were averaged. The rotarod test was used to assess motor coordination and balance. Mice had to keep their balance on a rotating rod at a continuous acceleration from 4 to 40 rpm in 300 s (Rotarod Version 1.2.0. MED Associates Inc., St. Albans, VT, USA). The time (or latency) it took the mouse to fall off the rod was measured. Each mouse had to perform three trials separated by 15 min each other, and the three trials were averaged. To identify differences in locomotor activity and exploratory behaviour, mice were tested in the open field. In this test, animals were placed at the border of a square arena (50 cm \times 50 cm) and allowed to explore the arena freely for 10 min. The arena was divided into three parts, including a border zone (within 8 cm of the wall), a centre zone (inner square of 20 cm \times 20 cm) and an intermediate zone. Locomotor activity was assessed by the total distance moved and the average velocity. To determine the exploratory

behaviour, the number of rearings within the 10 min was measured.

String agility test was performed to access forepaw grip capacity and agility. Mice were placed in the centre of a 50-cm long string suspended ~33 cm above a padded surface between two platforms. Mice were allowed to grip the string with only their forepaws and then released for a maximum of 60 s. A rating system, ranging between 0 and 5, was employed to assess string agility for a single 60 s trial (0 = animal unable to remain on string, 1 = hangs by two forepaws, 2 = attempts to climb onto string, 3 = two forepaws and one or both hindpaws around string, 4 = four paws and tail around string, with lateral movement, 5 = escape to the platform). As both *Cramping* and *Cra/FL α -/-* mice showed a severe defect in muscle string agility (from early age score 0), we further detected the time spent on the string till falling down giving the maximum of 60 s for the mice who reached the platform during the trial.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary Material is available at *HMG* Online.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Daniel P. Kelly for providing FL-PGC-1 α -/- mice. Ramona Langohr, Helga Mogel, Sylvie Padet, Annie Picchinnenna, Marie Jo Ruivo, Jérôme Sinniger and Tanja Wipp provided technical support for this study. We thank the Department of Electron Microscopy of Ulm University for help with this study. Publication costs are supported by the Neurex network (www.neurex.org).

Conflict of Interest statement. None declared.

FUNDING

This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche (Dynemit, L.D.) and the Thierry Latran Foundation (P.W. and L.D.), Association pour la recherche et le développement de moyens de lutte contre les maladies neurodégénératives (AREMANE) (J.P.L.), Helmholtz Institute (A.C.L., P.W. and L.D.). L.D. is supported by a Mercator Professorship (DFG, 2011–2012). K.R.-V. held an EFNS Scientific Fellowship at Ulm University.

REFERENCES

- Nunnari, J. and Suomalainen, A. (2012) Mitochondria: in sickness and in health. *Cell*, **148**, 1145–1159.
- Michel, S., Wanet, A., De Pauw, A., Rommelaere, G., Arnould, T. and Renard, P. (2012) Crosstalk between mitochondrial (dys)function and mitochondrial abundance. *J. Cell Physiol.*, **227**, 2297–2310.
- Durham, S.E., Samuels, D.C., Cree, L.M. and Chinnery, P.F. (2007) Normal levels of wild-type mitochondrial DNA maintain cytochrome c oxidase activity for two pathogenic mitochondrial DNA mutations but not for m.3243A->G. *Am. J. Hum. Genet.*, **81**, 189–195.
- Yu-Wai-Man, P., Sitarz, K.S., Samuels, D.C., Griffiths, P.G., Reeve, A.K., Bindoff, L.A., Horvath, R. and Chinnery, P.F. (2010) OPA1 mutations cause cytochrome c oxidase deficiency due to loss of wild-type mtDNA molecules. *Hum. Mol. Genet.*, **19**, 3043–3052.
- Sitarz, K.S., Yu-Wai-Man, P., Pyle, A., Stewart, J.D., Rautenstrauss, B., Seeman, P., Reilly, M.M., Horvath, R. and Chinnery, P.F. (2012) MFN2 mutations cause compensatory mitochondrial DNA proliferation. *Brain*, **135**, e219.
- Renaldo, F., Amati-Bonneau, P., Slama, A., Romana, C., Forin, V., Doummar, D., Barnerias, C., Bursztyn, J., Mayer, M., Khouri, N. *et al.* (2012) MFN2, a new gene responsible for mitochondrial DNA depletion. *Brain*, **135**, e223.
- Wenz, T., Diaz, F., Spiegelman, B.M. and Moraes, C.T. (2008) Activation of the PPAR/PGC-1 α pathway prevents a bioenergetic deficit and effectively improves a mitochondrial myopathy phenotype. *Cell Metab.*, **8**, 249–256.
- Dillon, L.M., Williams, S.L., Hida, A., Peacock, J.D., Prolla, T.A., Lincoln, J. and Moraes, C.T. (2012) Increased mitochondrial biogenesis in muscle improves aging phenotypes in the mtDNA mutant mouse. *Hum. Mol. Genet.*, **21**, 2288–2297.
- Da Cruz, S., Parone, P.A., Lopes, V.S., Lillo, C., McAlonis-Downes, M., Lee, S.K., Vetto, A.P., Petrosyan, S., Marsala, M., Murphy, A.N. *et al.* (2012) Elevated PGC-1 α activity sustains mitochondrial biogenesis and muscle function without extending survival in a mouse model of inherited ALS. *Cell Metab.*, **15**, 778–786.
- Aure, K., Fayet, G., Leroy, J.P., Lacene, E., Romero, N.B. and Lombes, A. (2006) Apoptosis in mitochondrial myopathies is linked to mitochondrial proliferation. *Brain*, **129**, 1249–1259.
- Miura, S., Tomitsuka, E., Kamei, Y., Yamazaki, T., Kai, Y., Tamura, M., Kita, K., Nishino, I. and Ezaki, O. (2006) Overexpression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator-1 α leads to muscle atrophy with depletion of ATP. *Am. J. Pathol.*, **169**, 1129–1139.
- Lehman, J.J., Barger, P.M., Kovacs, A., Saffitz, J.E., Medeiros, D.M. and Kelly, D.P. (2000) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 promotes cardiac mitochondrial biogenesis. *J. Clin. Invest.*, **106**, 847–856.
- Ylikallio, E., Tyynismaa, H., Tsutsui, H., Ide, T. and Suomalainen, A. (2010) High mitochondrial DNA copy number has detrimental effects in mice. *Hum. Mol. Genet.*, **19**, 2695–2705.
- Lin, J., Wu, H., Tarr, P.T., Zhang, C.Y., Wu, Z., Boss, O., Michael, L.F., Puigserver, P., Isotani, E., Olson, E.N. *et al.* (2002) Transcriptional co-activator PGC-1 α drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature*, **418**, 797–801.
- Masiero, E., Agatea, L., Mammucari, C., Blaauw, B., Loro, E., Komatsu, M., Metzger, D., Reggiani, C., Schiaffino, S. and Sandri, M. (2009) Autophagy is required to maintain muscle mass. *Cell Metab.*, **10**, 507–515.
- Viscomi, C., Bottani, E., Civiletto, G., Cerutti, R., Moggio, M., Fagiolari, G., Schon, E.A., Lamperti, C. and Zeviani, M. (2011) In vivo correction of COX deficiency by activation of the AMPK/PGC-1 α axis. *Cell Metab.*, **14**, 80–90.
- Hollenbeck, P.J. and Saxton, W.M. (2005) The axonal transport of mitochondria. *J. Cell. Sci.*, **118**, 5411–5419.
- Eschbach, J., Sinniger, J., Bouitbir, J., Fergani, A., Schlagowski, A.I., Zoll, J., Geny, B., Rene, F., Larmet, Y., Marion, V. *et al.* (2013) Dynein mutations associated with hereditary motor neuropathies impair mitochondrial morphology and function with age. *Neurobiol. Dis.*, **58C**, 220–230.
- Harms, M.B., Ori-McKenney, K.M., Scoto, M., Tuck, E.P., Bell, S., Ma, D., Masi, S., Allred, P., Al-Lozi, M., Reilly, M.M. *et al.* (2012) Mutations in the tail domain of DYNC1H1 cause dominant spinal muscular atrophy. *Neurology*, **78**, 1714–1720.
- Weedon, M.N., Hastings, R., Caswell, R., Xie, W., Paszkiewicz, K., Antoniadis, T., Williams, M., King, C., Greenhalgh, L., Newbury-Ecob, R. *et al.* (2011) Exome sequencing identifies a DYNC1H1 mutation in a large pedigree with dominant axonal Charcot-Marie-Tooth disease. *Am. J. Hum. Genet.*, **89**, 308–312.
- Handschin, C. and Spiegelman, B.M. (2006) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 coactivators, energy homeostasis, and metabolism. *Endocr. Rev.*, **27**, 728–735.
- Ruas, J.L., White, J.P., Rao, R.R., Kleiner, S., Brannan, K.T., Harrison, B.C., Greene, N.P., Wu, J., Estall, J.L., Irving, B.A. *et al.* (2012) A PGC-1 α isoform induced by resistance training regulates skeletal muscle hypertrophy. *Cell*, **151**, 1319–1331.
- Chinsomboon, J., Ruas, J., Gupta, R.K., Thom, R., Shoag, J., Rowe, G.C., Sawada, N., Raghuram, S. and Arany, Z. (2009) The transcriptional coactivator PGC-1 α mediates exercise-induced angiogenesis in skeletal muscle. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **106**, 21401–21406.

24. Zhang, Y., Huypens, P., Adamson, A.W., Chang, J.S., Henagan, T.M., Boudreau, A., Lenard, N.R., Burk, D., Klein, J., Perwitz, N. *et al.* (2009) Alternative mRNA splicing produces a novel biologically active short isoform of PGC-1alpha. *J. Biol. Chem.*, **284**, 32813–32826.
25. Tsunemi, T., Ashe, T.D., Morrison, B.E., Soriano, K.R., Au, J., Roque, R.A., Lazarowski, E.R., Damian, V.A., Masliah, E. and La Spada, A.R. (2012) PGC-1alpha rescues Huntington's disease proteotoxicity by preventing oxidative stress and promoting TFEB function. *Sci. Transl. Med.*, **4**, 142ra197.
26. Handschin, C., Chin, S., Li, P., Liu, F., Maratos-Flier, E., Lebrasseur, N.K., Yan, Z. and Spiegelman, B.M. (2007) Skeletal muscle fiber-type switching, exercise intolerance, and myopathy in PGC-1alpha muscle-specific knock-out animals. *J. Biol. Chem.*, **282**, 30014–30021.
27. Lin, J., Wu, P.H., Tarr, P.T., Lindenberg, K.S., St-Pierre, J., Zhang, C.Y., Mootha, V.K., Jager, S., Vianna, C.R., Reznick, R.M. *et al.* (2004) Defects in adaptive energy metabolism with CNS-linked hyperactivity in PGC-1alpha null mice. *Cell*, **119**, 121–135.
28. Leone, T.C., Lehman, J.J., Finck, B.N., Schaeffer, P.J., Wende, A.R., Boudina, S., Courtois, M., Wozniak, D.F., Sambandam, N., Bernal-Mizrachi, C. *et al.* (2005) PGC-1alpha deficiency causes multi-system energy metabolic derangements: muscle dysfunction, abnormal weight control and hepatic steatosis. *PLoS Biol.*, **3**, e101.
29. Chang, J.S., Fernand, V., Zhang, Y., Shin, J., Jun, H.J., Joshi, Y. and Gettys, T.W. (2012) NT-PGC-1alpha protein is sufficient to link beta3-adrenergic receptor activation to transcriptional and physiological components of adaptive thermogenesis. *J. Biol. Chem.*, **287**, 9100–9111.
30. Braunstein, K.E., Eschbach, J., Rona-Voros, K., Soylyu, R., Mikrouli, E., Larmet, Y., Rene, F., De Aguilar, J.L., Loeffler, J.P., Muller, H.P. *et al.* (2010) A point mutation in the dynein heavy chain gene leads to striatal atrophy and compromises neurite outgrowth of striatal neurons. *Hum. Mol. Genet.*, **19**, 4385–4398.
31. Scarpulla, R.C. (2011) Metabolic control of mitochondrial biogenesis through the PGC-1 family regulatory network. *Biochim. Biophys. Acta*, **1813**, 1269–1278.
32. Chang, J.S., Huypens, P., Zhang, Y., Black, C., Kralli, A. and Gettys, T.W. (2010) Regulation of NT-PGC-1alpha subcellular localization and function by protein kinase A-dependent modulation of nuclear export by CRM1. *J. Biol. Chem.*, **285**, 18039–18050.
33. Shen, T., Liu, Y. and Schneider, M.F. (2012) Localization and regulation of the N terminal splice variant of PGC-1alpha in adult skeletal muscle fibers. *J. Biomed. Biotechnol.*, **2012**, 989263.
34. Lustig, Y., Ruas, J.L., Estall, J.L., Lo, J.C., Devarakonda, S., Laznik, D., Choi, J.H., Ono, H., Olsen, J.V. and Spiegelman, B.M. (2011) Separation of the gluconeogenic and mitochondrial functions of PGC-1{alpha} through S6 kinase. *Genes Dev.*, **25**, 1232–1244.
35. Bentzinger, C.F., Romanino, K., Cloetta, D., Lin, S., Mascarenhas, J.B., Oliveri, F., Xia, J., Casanova, E., Costa, C.F., Brink, M. *et al.* (2008) Skeletal muscle-specific ablation of raptor, but not of rictor, causes metabolic changes and results in muscle dystrophy. *Cell Metab.*, **8**, 411–424.
36. Risson, V., Mazelin, L., Roceri, M., Sanchez, H., Moncollin, V., Corneloup, C., Richard-Bulteau, H., Vignaud, A., Baas, D., Defour, A. *et al.* (2009) Muscle inactivation of mTOR causes metabolic and dystrophin defects leading to severe myopathy. *J. Cell. Biol.*, **187**, 859–874.
37. Cunningham, J.T., Rodgers, J.T., Arlow, D.H., Vazquez, F., Mootha, V.K. and Puigserver, P. (2007) mTOR controls mitochondrial oxidative function through a YY1-PGC-1alpha transcriptional complex. *Nature*, **450**, 736–740.
38. Blattler, S.M., Verdeguer, F., Liesa, M., Cunningham, J.T., Vogel, R.O., Chim, H., Liu, H., Romanino, K., Shirihai, O.S., Vazquez, F. *et al.* (2012) Defective mitochondrial morphology and bioenergetic function in mice lacking the transcription factor yin yang 1 in skeletal muscle. *Mol. Cell. Biol.*, **32**, 3333–3346.
39. Aquilano, K., Vigilanza, P., Baldelli, S., Pagliei, B., Rotilio, G. and Ciriolo, M.R. (2010) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator 1alpha (PGC-1alpha) and sirtuin 1 (SIRT1) reside in mitochondria: possible direct function in mitochondrial biogenesis. *J. Biol. Chem.*, **285**, 21590–21599.
40. Safdar, A., Little, J.P., Stokl, A.J., Hettinga, B.P., Akhtar, M. and Tamopolsky, M.A. (2011) Exercise increases mitochondrial PGC-1alpha content and promotes nuclear-mitochondrial cross-talk to coordinate mitochondrial biogenesis. *J. Biol. Chem.*, **286**, 10605–10617.
41. Eschbach, J., Fergani, A., Oudart, H., Robin, J.P., Rene, F., Gonzalez de Aguilar, J.L., Larmet, Y., Zoll, J., Hafezparast, M., Schwalenstocker, B. *et al.* (2011) Mutations in cytoplasmic dynein lead to a Huntington's disease-like defect in energy metabolism of brown and white adipose tissues. *Biochim. Biophys. Acta*, **1812**, 59–69.
42. Puigserver, P., Wu, Z., Park, C.W., Graves, R., Wright, M. and Spiegelman, B.M. (1998) A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell*, **92**, 829–839.
43. Rodriguez-Cuenca, S., Pujol, E., Justo, R., Frontera, M., Oliver, J., Gianotti, M. and Roca, P. (2002) Sex-dependent thermogenesis, differences in mitochondrial morphology and function, and adrenergic response in brown adipose tissue. *J. Biol. Chem.*, **277**, 42958–42963.
44. Eschbach, J., Schwalenstocker, B., Soyol, S.M., Bayer, H., Wiesner, D., Akimoto, C., Nilsson, A.C., Birve, A., Meyer, T., Dupuis, L. *et al.* (2013) PGC-1alpha is a male-specific disease modifier of human and experimental amyotrophic lateral sclerosis. *Hum. Mol. Genet.*, **22**, 3477–3484.
45. Wenz, T. (2009) PGC-1alpha activation as a therapeutic approach in mitochondrial disease. *IUBMB Life*, **61**, 1051–1062.
46. Srivastava, S., Diaz, F., Iommarini, L., Aure, K., Lombes, A. and Moraes, C.T. (2009) PGC-1alpha/beta induced expression partially compensates for respiratory chain defects in cells from patients with mitochondrial disorders. *Hum. Mol. Genet.*, **18**, 1805–1812.
47. Yatsuga, S. and Suomalainen, A. (2012) Effect of bezafibrate treatment on late-onset mitochondrial myopathy in mice. *Hum. Mol. Genet.*, **21**, 526–535.
48. Soyol, S.M., Felder, T.K., Auer, S., Hahne, P., Oberkofler, H., Witting, A., Paulmichl, M., Landwehrmeyer, G.B., Weydt, P. and Patsch, W. (2012) A greatly extended PPARGC1A genomic locus encodes several new brain-specific isoforms and influences Huntington disease age of onset. *Hum. Mol. Genet.*, **21**, 3461–3473.
49. Hafezparast, M., Klocke, R., Ruhrberg, C., Marquardt, A., Ahmad-Annuar, A., Bowen, S., Lalli, G., Witherden, A.S., Hummerich, H., Nicholson, S. *et al.* (2003) Mutations in dynein link motor neuron degeneration to defects in retrograde transport. *Science*, **300**, 808–812.
50. Weydt, P., Pineda, V.V., Torrence, A.E., Libby, R.T., Satterfield, T.F., Lazarowski, E.R., Gilbert, M.L., Morton, G.J., Bammler, T.K., Strand, A.D. *et al.* (2006) Thermoregulatory and metabolic defects in Huntington's disease transgenic mice implicate PGC-1alpha in Huntington's disease neurodegeneration. *Cell Metab.*, **4**, 349–362.

Discussion

L'objectif de cette thèse était de caractériser la nouvelle lignée CHMP2B^{intron5} afin de déterminer si l'expression neuronale de la mutation CHMP2B^{intron5} induit une pathologie reproduisant le continuum SLA-DFT. Nous avons montré que cette lignée développe des atteintes histologiques ainsi que des défauts moteurs et des changements de comportement caractéristiques de la SLA et de la DFT.

Les souris CHMP2B^{intron5} présentent des marqueurs histologiques de SLA et de DFT dans le SNC. Nous avons montré la présence d'agrégats de la protéine CHMP2B^{intron5} dans les neurones où elle est exprimée, notamment dans les MN et dans le cortex frontal. Des inclusions positives pour l'ubiquitine et p62 sont également présentes dans ces mêmes neurones. En revanche, TDP-43 présente une localisation subcellulaire normale. Les inclusions positives pour l'ubiquitine et p62 mais négatives pour TDP-43 reflètent le profil histopathologique des patients porteurs de mutations CHMP2B^{intron5} (Holm et al., 2007) ainsi que des patients SLA porteurs de mutations CHMP2B (Parkinson et al., 2006). Des agrégats ont été observés dans l'hippocampe des patients (Holm et al., 2007), alors que nous n'en avons pas observé chez les souris. Ces différences peuvent être expliquées par des différences d'expression du transgène dans différentes zones du CNS. Dans les lignées de souris transgéniques utilisant le promoteur Thy1.2 celui-ci est activé de façon variable en fonction des zones du cerveau et varie également en fonction des lignées (Caroni, 1997). Dans notre lignée, l'expression relativement faible du transgène dans l'hippocampe peut expliquer l'absence d'agrégats.

Par ailleurs, les souris CHMP2B^{intron5} développent une astrocytose, notamment dans le cortex frontal et la corne ventrale de la moelle épinière, ce qui est un autre marqueur de DFT ou de SLA. Cette astrocytose a été observée dès 6 mois chez les souris transgéniques HE et HO, c'est à dire bien avant que les souris HE ne montrent d'atteinte motrice ou comportementale. Cela indique donc que l'astrocytose est un événement précoce dans le développement de la pathologie associée à CHMP2B^{intron5}.

Une lignée transgénique exprimant la mutation CHMP2B^{intron5} a été décrite en 2012 par Ghazi-Noori et collègues (Ghazi-Noori et al., 2012). Les auteurs ont étudié l'effet de l'expression de cette mutation sous le contrôle du promoteur prion de hamster. Ce promoteur est communément utilisé pour induire une expression dans les cellules du SNC et dans d'autres organes de façon plus faible; cependant, aucune description précise

de la distribution du transgène dans le SNC n'a été publiée. Ces auteurs observent l'accumulation d'inclusions positives pour p62 et l'ubiquitine dans le cerveau et la moelle épinière, ce qui est en accord avec nos propres résultats. Comme chez nos souris, ceci est accompagné d'une activation gliale et de dégénérescence axonale. Les auteurs montrent que ces marqueurs pathologiques ne sont pas présents chez des souris exprimant CHMP2B humain sauvage ou chez des souris où le gène *CHMP2B* est invalidé, indiquant un gain de fonction de la protéine mutée. Contrairement à ce que nous avons observé chez nos souris, les auteurs ne rapportent pas d'atteinte motrice ou comportementale. Cette différence peut s'expliquer par une différence du niveau d'expression du transgène. Ghazi-Noori et collègues montrent une expression trois fois supérieure de l'ARNm du transgène par rapport au CHMP2B endogène, par contre au niveau protéique, CHMP2B^{intron5} est exprimé au même niveau que CHMP2B sauvage endogène, ce qui montre une régulation post-transcriptionnelle de l'expression de CHMP2B. Par ailleurs, aucune information quant au niveau d'expression à l'échelle cellulaire n'est fournie, or nous avons montré par immunohistochimie dans notre lignée que l'expression de la protéine varie de façon importante en fonction des populations neuronales étudiées. Il est donc possible d'envisager de telles variations dans leur lignée. Une autre différence est le fond génétique des souris: Les souris transgéniques présentées par Ghazi-Noori et collègues sont maintenues sur un fond génétique C57BL/6, alors que nos souris ont un fond génétique mixte issus du croisement de lignées C57BL/6, FVB et B6D2; or, il est connu que le fond génétique peut influencer de façon importante le phénotype des souris transgéniques comme cela a été montré pour les modèles de SLA (Heiman-Patterson et al., 2011).

A. Les souris CHMP2B^{intron5} en tant que modèle de SLA

La mutation CHMP2B^{intron5} exprimée par notre lignée de souris est une mutation responsable de DFT et qui n'a pas pour le moment été associée à des symptômes de SLA chez l'humain, pourtant les souris développent des atteintes motrices et une dénervation semblables à celles décrites dans la SLA. Ceci peut paraître paradoxal, pourtant une autre mutation humaine, la mutation Q206H, est responsable de SLA chez plusieurs patients non apparentés et est située dans la partie C-terminale de la protéine,

or la mutation CHMP2B^{intron5} conduit à une troncation de la partie C-terminale. De plus l'expression dans des cellules en culture de chacune de ces mutations conduit à des phénotypes semblables avec l'accumulation de vacuoles cytoplasmiques et des défauts de fonctionnement de l'autophagie. Enfin, l'étude de Lee et collègues montre que la pathogénicité de la mutation CHMP2B^{intron5} est due à un défaut de liaison à la protéine Snf7 (Lee et al., 2007), or la mutation Q206H provoque justement une substitution d'acide aminé sur le site de liaison à Snf7. Il est donc possible que ces deux mutations conduisent aux mêmes défauts de fonctionnement de la protéine, liés à la partie C-terminale de CHMP2B et en particulier à l'interaction avec Snf7. Ces mêmes défauts de fonctionnement conduiraient soit à une DFT dans le cas de la famille danoise de DFT-3, soit à une SLA en fonction de facteurs génétiques ou environnementaux. Ainsi, il est logique que la mutation CHMP2B^{intron5} puisse provoquer des symptômes moteurs semblables à la SLA chez les souris. On peut d'ailleurs envisager que fond génétique mixte de notre lignée puisse favoriser la mise en place de ces symptômes moteurs.

Parmi les symptômes moteurs observés chez les souris CHMP2B^{intron5}, nous avons observé une réduction de la force musculaire en test d'agrippement (grip test), une diminution de la coordination motrice en rotarod et une paralysie progressive des membres postérieurs puis antérieurs. Ces défauts sont communément observés dans les modèles de SLA, notamment ceux basés sur des mutations SOD1 (Canton et al., 1998; Weydt et al., 2003) ou TDP-43 (Swarup et al., 2011). De plus, ces défauts apparaissent progressivement à partir de 12 mois chez les souris HE, ce qui est en accord avec la SLA qui se déclare chez des adultes à un âge moyen de 65 ans (Chiò et al., 2013). De ce point de vue, les souris HE présentent un phénotype plus proche de la SLA que les souris HO qui présentent des symptômes moteurs beaucoup plus tôt (dès deux mois) ainsi qu'un défaut de prise de poids dès deux mois.

Une des atteintes spécifiques aux maladies du motoneurones et à la SLA en particulier, est la dénervation musculaire. Nous avons observé cette dénervation dans les muscles gastrocnémien et *tibialis* antérieur des souris CHMP2B^{intron5} à des stades très tardifs de la maladie. En électromyographie (EMG), cette dénervation apparaît cependant limitée comparée aux profils EMG des patients ou des souris SOD1. Ce profil EMG s'explique par le fait que la plupart des jonctions neuromusculaires ne sont que partiellement dénervées et que peu d'entre elles présentent une dénervation totale, ainsi que nous l'avons montré par des marquages immunohistochimiques. Ainsi, il est

possible que ces JNM morphologiquement dégradées et partiellement dénervées puissent continuer à inhiber l'activité électrique spontanée du muscle sans pour autant être capable de déclencher la contraction musculaire.

Dans la SLA, les MNs meurent, or nous n'avons observé aucune mort des MNs chez les souris CHMP2B^{intron5}, mêmes à des stades tardifs de la pathologie. Cette différence peut être expliquée comme suit: nous observons chez les souris CHMP2B^{intron5} un phénomène de neurodégénérescence qui est ralenti par rapport à ce qui se passe dans la SLA chez le patient. L'expression de CHMP2B^{intron5} induit un dysfonctionnement du motoneurone et provoque un démantèlement de la JNM et une axonopathie. Le dysfonctionnement et/ou la perte de la JNM provoque la mort de l'animal avant que l'on puisse observer la mort des motoneurones comme on peut l'observer chez l'humain ou dans d'autres modèles animaux de la SLA, notamment les souris SOD1. Plusieurs indices montrent que la mort des motoneurones serait l'étape finale d'une dégénérescence commençant au niveau distal, c'est à dire touchant la JNM, puis l'axone et finalement le soma du MN. Il s'agit de la théorie du "dying back" ou mort rétrograde. Plusieurs études ont montré que chez les souris SOD1 G93A, la dénervation de la JNM suivie de l'axonopathie est le phénomène le plus précoce du processus neurodégénératif et intervient bien avant qu'une perte de motoneurones ne soit observée (Fischer et al., 2004; Frey et al., 2000; Vinsant et al., 2013). L'étude de Fischer et collègues rapporte de plus le cas d'un patient SLA décédé accidentellement à un stade précoce de sa maladie (6 mois après le diagnostic) présentant une dénervation des JNM mais un aspect normal de la corne ventrale de la moelle épinière. Ce cas isolé suggère que la mort des motoneurones est un phénomène tardif dans la SLA. De plus, la protection des motoneurones dans deux modèles différents de SLA ne retarde que modérément l'apparition des symptômes et n'empêche pas la dénervation musculaire ni la mort des animaux (Gould et al., 2006; Rouaux et al., 2007).

B. Les souris CHMP2B^{intron5} en tant que modèle de DFT

Nous avons mis en évidence des effets de l'expression de CHMP2B^{intron5} sur plusieurs types de comportement: le comportement alimentaire, le comportement social et les stéréotypies. Seules les souris HO développent de façon systématique ces atteintes,

cependant les souris HE n'ont pas été testées au delà de 12 mois. Il est donc possible que les atteintes comportementales apparaissent tardivement chez les souris HE et qu'elles ne soient pas encore détectables à 12 mois, de la même façon que les atteintes motrices sont modestes à 12 mois mais sont beaucoup plus sévères à 24 mois. Ainsi, il serait intéressant de tester le comportement des souris HE à 18 mois, un âge intermédiaire où elles sont susceptibles de présenter des changements de comportement mais où leurs fonctions motrices sont suffisamment préservées pour leur permettre d'accomplir les tests.

Les souris HO présentent une préférence pour le sucre réduite par rapport aux souris WT et HE. Ceci est l'inverse de ce qui est observé chez les patients, qui développent une préférence pour la nourriture sucrée (Piguet, 2011). Par contre, l'augmentation moyenne de la prise alimentaire associée à l'augmentation du nombre de visites des croquettes est cohérente avec la glotonnerie observée chez les patients atteints de DFT (Woolley et al., 2007).

L'observation des souris dans leur cage habituelle en présence de leur fratrie a permis l'évaluation du comportement spontané des souris. Nous avons montré que les souris HO initient moins de contact avec leurs congénères que les souris WT et HE, suggérant un moindre intérêt social. Ceci est cohérent avec le désintérêt social présenté par les patients DFT (Rascovsky et al., 2011). Il serait néanmoins intéressant de confirmer ces résultats par des tests de comportement social plus classiques et peut-être plus sensibles, comme le test des trois chambres (three chamber test). Il est intéressant de noter que deux modèles de DFT basés sur l'extinction de la PGRN ont montré un désintérêt social dans ce paradigme (Filiano et al., 2013; F. Yin, Dumont, et al., 2010). Les souris HO développent des stéréotypies, tout comme les patients souffrant de DFT (Prioni et al., 2012).

Par contre, nous n'avons pas détecté de comportement désinhibé chez les souris transgéniques dans le test obscurité/lumière. Cependant, au cours de ce test, les souris HE ont montré une hyperactivité transitoire à l'âge de 6 mois que nous n'avons cependant pas retrouvée à 12 mois. Étonnamment, les mesures d'actimétrie sur trois jours ne montrent pas d'hyperactivité à 6 mois, mais une hyperactivité spécifiquement le matin à 12 mois.

Nous avons utilisé une batterie de tests pour évaluer la fonction de différentes aires du cerveau impliquées dans la mémoire et l'apprentissage. Le test de déplacement

d'objets est dépendant de l'hippocampe et du cortex entorhinal médian (Van Cauter et al., 2013), tandis que le test de duplication d'objet est dépendant du cortex entorhinal latéral (Wilson, Watanabe, Milner, & Ainge, 2013) et du cortex préfrontal (Barker et al., 2007). La mémoire spatiale, testée avec le labyrinthe de Barnes, dépend de l'hippocampe. Bien que les patients DFT présentent une mémoire spatiale relativement préservée, ils présentent une atrophie au niveau de l'hippocampe et du cortex entorhinal comparable à celle des patients souffrant de la maladie d'Alzheimer (de Souza et al., 2013; Laakso et al., 2000). Nos souris n'ont pas montré de défaut de mémoire ni d'apprentissage dans aucun des tests mis en oeuvre, ce qui indique une préservation des neurones de l'hippocampe et du cortex entorhinal et préfrontal. La préservation des fonctions liées à l'hippocampe peut s'expliquer par l'expression du transgène relativement faible dans cette aire comparée à d'autres aires du cerveau et par l'absence d'agrégats observés dans l'hippocampe. Par contre, le transgène est fortement exprimé dans le cortex entorhinal. Il est possible que des défauts de mémoire liée aux différentes zones du cortex entorhinal se développent à des stades plus avancés de la pathologie, aussi, il serait intéressant de tester une nouvelle cohorte de souris à 18 mois.

Les fonctions exécutives englobent les fonctions liées aux comportements complexes ou orientés vers un but. Elles sont contrôlées par le cortex préfrontal et sont particulièrement affectées dans la DFT (Johns et al., 2009; Possin et al., 2013; Tartaglia et al., 2012). Une inflexibilité comportementale est souvent observée chez les patients DFT (Klanker, Feenstra, & Denys, 2013) et s'inscrit de façon plus large dans les défauts des fonctions exécutives. Elle se manifeste par un attachement excessif à des habitudes ou par la volonté de ne plus manger qu'un seul type de plat. Chez les souris, l'inflexibilité comportementale peut être mesurée en les forçant à apprendre de nouvelles règles suite à un apprentissage (Bissonette & Powell, 2012). Les souris transgéniques n'ont pas développé d'inflexibilité comportementale dans le test du labyrinthe de Barnes inversé. La capacité de concentration fait également partie des fonctions exécutives. Les souris HO ont montré un profil d'exploration en champ ouvert suggérant un manque de concentration puisque les souris changent souvent de direction, contrairement aux souris WT et HE. De plus, les souris HO ont fait plus d'erreurs répétitives au cours du test de Barnes, suggérant des défauts de concentration ou de mémoire de travail. Ceci est particulièrement intéressant car des défauts de concentration sont fréquents dans la

DFT, et apparaissent à un stade pré-symptomatique chez les porteurs de la mutation CHMP2B^{intron5} (Stokholm et al., 2013).

En conclusion, les souris HO développent certaines altérations du comportement correspondant aux symptômes de la DFT: des changements du comportement alimentaire, un désintérêt social, des stéréotypies et des défauts de concentration. La mémoire est préservée, comme c'est le cas chez les patients DFT. Par contre, Les souris transgéniques ne développent pas tous les aspects de la DFT: nous n'avons pas observé de désinhibition ni d'inflexibilité comportementale.

C. Hypothèses sur les mécanismes mis en jeu

Plusieurs hypothèses peuvent expliquer les mécanismes conduisant aux atteintes motrices et comportementales observées chez les souris CHMP2B^{intron}. Une atteinte de la fonction autophagique de CHMP2B est une première possibilité. De nombreux agrégats ont été observés de façon dans les neurones, et plus particulièrement dans les MN qui sont dysfonctionnels. Ces agrégats apparaissent chez les souris HE avant l'apparition des symptômes moteurs, ceci indique qu'ils sont une cause potentielle du dysfonctionnement neuronale et non une cause tardive de ce dysfonctionnement. De plus, Nous avons observé des agrégats positifs pour p62 mais négatifs pour CHMP2B^{intron5}, suggérant qu'à l'accumulation de CHMP2B^{intron5} dans les neurones s'ajoute une atteinte du système autophagique. En effet, des études *in vitro* supportent l'hypothèse d'un dysfonctionnement de la voie autophagique: l'expression de CHMP2B^{intron5} dans des cellules conduit à l'accumulation d'autophagosomes et d'amphisomes (Filimonenko et al., 2007). Dans des cultures primaires de neurones murins et chez la drosophile, l'expression de CHMP2B^{intron5} conduit à l'accumulation d'autophagosomes par l'inhibition de leur fusion avec le lysosome (Lee et al., 2007). Cette étude montre de plus un gain de fonction de CHMP2B^{intron5} qui séquestre son partenaire Snf-7 (CHMP4), ce qui empêche la dissociation du complexe ESCRTIII et la poursuite des étapes de l'autophagie. De plus, une étude publiée en 2010 montre que CHMP2B^{intron5} empêche le recrutement de la protéine Rab7 nécessaire à la fusion de l'autophagosome et du lysosome (Urwin et al., 2010). Enfin, l'hypothèse d'un dysfonctionnement de la voie autophagique chez les patients porteurs de mutations

CHMP2B est supportée par l'accumulation de vacuoles de type endosome, indiquant un défaut de dégradation de ces vacuoles par autophagie (L. E. Cox et al., 2010; Urwin et al., 2010; van der Zee et al., 2008).

Une autre hypothèse concernant les mécanismes conduisant à des atteintes motrices et comportementales chez les souris CHMP2B^{intron5} serait l'existence d'un défaut de communication synaptique. Il a en effet été montré que l'expression de CHMP2B^{intron5} dans des neurones altère la maturation des épines dendritiques (Belly et al., 2010) et diminue le nombre de dendrites (Belly et al., 2010; Lee et al., 2007). De façon plus générale, l'importance de la fonction synaptique dans la SLA et la DFT a été montrée dans plusieurs modèles: Un modèle murin de DFT basée sur l'expression de la mutation P301L de tau présente des défauts de plasticité synaptique dans l'hippocampe (Levenga et al., 2013) et un autre modèle basé sur l'extinction de la PGRN montre des défauts synaptiques dans l'hippocampe dus à un raccourcissement des dendrites et une réduction du nombre d'épines dendritiques (Petkau et al., 2012). Enfin, une étude chez la drosophile montre un rôle de TDP-43 dans la formation des dendrites (Lu, Ferris, & Gao, 2009).

Notre modèle de SLA-DFT est basé sur l'expression de la protéine humaine mutée CHMP2B^{intron5}. Comme chez les patients, les souris CHMP2B^{intron5} HE et HO expriment toujours la protéine sauvage. Cependant, le rapport d'expression entre l'ARNm CHMP2B^{intron5} et l'ARNm sauvage est bien plus important dans notre lignée que chez le patient, puisque CHMP2B^{intron5} est cinq fois plus exprimé que CHMP2B sauvage chez les souris HE et dix fois plus chez les souris HO, alors que chez les patients CHMP2B^{intron5} est exprimé à hauteur de 35% du CHMP2B sauvage (Urwin et al., 2010). Cette différence peut être expliquée par deux faits: d'une part le nombre de copies du transgène inséré dans le génome des souris et d'autre part la nature du transgène utilisé. Les souris HE et HO portent respectivement 6 et 12 copies du transgène et portent 2 copies de *CHMP2B* endogène. Les patients quant à eux portent une copie du gène muté et une copie du gène sauvage, la mutation étant dominante. D'autre part, cette différence d'expression peut être expliquée par la force du promoteur: le transgène étant exprimé sous le contrôle du promoteur Thy1.2, il est tout à fait possible que celui-ci soit plus actif que le promoteur de *CHMP2B* dans les neurones.

Une grande différence de phénotype est présente entre les souris HE et HO. En effet, les souris HE présentent des atteintes motrices tardives qui progressent lentement et ont une durée de vie plus courte de seulement quelques semaines par rapport aux souris WT. Par contre, les souris HO présentent des atteintes motrices dès deux mois, ont une durée de vie courte et présentent des atteintes comportementales qui n'ont pas été mises en évidence chez les souris HE.

En conclusion, nous avons généré une lignée transgénique exprimant dans les neurones la protéine mutée CHMP2B^{intron5}. Le gène CHMP2B est associé à des cas de SLA et de DFT et, plus particulièrement, la mutation CHMP2B^{intron5} cause la DFT. Cette expression spécifique dans les neurones provoque l'accumulation d'agrégats protéiques contenant CHMP2B^{intron5}, l'ubiquitine et p62 ainsi qu'une astrocytose dans le cerveau et la moelle épinière. Ces atteintes histologiques sont des marqueurs typiques à la fois de la DFT (pour les atteintes dans le cerveau) et de la SLA (pour les atteintes dans le cerveau et la moelle épinière). Les souris développent une maladie du motoneurone, avec une dégénérescence de la JNM, une axonopathie et l'accumulation d'agrégats protéiques dans le corps cellulaire des MN sans qu'il y ait pour autant perte de ceux-ci. Ces altérations sont accompagnées d'une dénervation musculaire partielle et de défaut moteurs progressifs, notamment une diminution de la force musculaire, une coordination motrice altérée, des défauts de la posture et de la démarche. Les souris montrent de plus des signes de démence rappelant la DFT: des altération de la prise alimentaire, un désintérêt social et des stéréotypies, tout en conservant leurs fonctions de mémoire et d'apprentissage. Ainsi, l'expression conditionnelle neuronale de CHMP2B^{intron5} induit un phénotype de type SLA-DFT. Cette lignée constitue un outil pour l'étude des mécanismes pathologiques "cellule autonomes" communs à la SLA et la DFT.

Bibliographie

- Afifi, A. K., Aleu, F. P., Goodgold, J., & MacKay, B. (1966). Ultrastructure of atrophic muscle in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology*, *16*(5), 475–81. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5949060>
- Ahmed, Z., Mackenzie, I. R. A., Hutton, M. L., & Dickson, D. W. (2007). Progranulin in frontotemporal lobar degeneration and neuroinflammation. *Journal of Neuroinflammation*, *4*, 7. doi:10.1186/1742-2094-4-7
- Al-Chalabi, A., Jones, A., Troakes, C., King, A., Al-Sarraj, S., & van den Berg, L. H. (2012). The genetics and neuropathology of amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathologica*, *124*(3), 339–52. doi:10.1007/s00401-012-1022-4
- Arai, T., Nonaka, T., Hasegawa, M., Akiyama, H., Yoshida, M., Hashizume, Y., ... Ikeda, K. (2003). Neuronal and glial inclusions in frontotemporal dementia with or without motor neuron disease are immunopositive for p62. *Neuroscience Letters*, *342*(1-2), 41–4. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12727313>
- Babst, M., Katzmann, D. J., Estepa-Sabal, E. J., Meerloo, T., & Emr, S. D. (2002). Escrt-III An endosome-associated heterooligomeric protein complex required for mvb sorting. *Developmental Cell*, *3*(2), 271–282. doi:10.1016/S1534-5807(02)00220-4
- Badadani, M., Nalbandian, A., Watts, G. D., Vesa, J., Kitazawa, M., Su, H., ... Kimonis, V. E. (2010). VCP associated inclusion body myopathy and paget disease of bone knock-in mouse model exhibits tissue pathology typical of human disease. *PLoS One*, *5*(10). doi:10.1371/journal.pone.0013183
- Barker, G. R. I., Bird, F., Alexander, V., & Warburton, E. C. (2007). Recognition memory for objects, place, and temporal order: a disconnection analysis of the role of the medial prefrontal cortex and perirhinal cortex. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *27*(11), 2948–57. doi:10.1523/JNEUROSCI.5289-06.2007
- Beers, D. R., Henkel, J. S., Zhao, W., Wang, J., & Appel, S. H. (2008). CD4+ T cells support glial neuroprotection, slow disease progression, and modify glial morphology in an animal model of inherited ALS. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(40), 15558–63. doi:10.1073/pnas.0807419105
- Beers, D. R., Henkel, J. S., Zhao, W., Wang, J., Huang, A., Wen, S., ... Appel, S. H. (2011). Endogenous regulatory T lymphocytes ameliorate amyotrophic lateral sclerosis in mice and correlate with disease progression in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Brain : A Journal of Neurology*, *134*(Pt 5), 1293–314. doi:10.1093/brain/awr074
- Bei Hu, Ross, L., Neuhaus, J., Knopman, D., Kramer, J., Boeve, B., ... Boxer, A. L. (2010). Off-label medication use in frontotemporal dementia. *American Journal of Alzheimer's Disease and Other Dementias*, *25*(2), 128–33. doi:10.1177/1533317509356692
- Belly, A., Bodon, G., Blot, B., Bouron, A., Sadoul, R., & Goldberg, Y. (2010). CHMP2B mutants linked to frontotemporal dementia impair maturation of dendritic spines. *Journal of Cell Science*, *123*(Pt 17), 2943–54. doi:10.1242/jcs.068817
- Berg, T. O., Fengsrud, M., Stromhaug, P. E., Berg, T., & Seglen, P. O. (1998). Isolation and Characterization of Rat Liver Amphisomes: EVIDENCE FOR FUSION OF AUTOPHAGOSOMES WITH BOTH EARLY AND LATE ENDOSOMES. *Journal of Biological Chemistry*, *273*(34), 21883–21892. doi:10.1074/jbc.273.34.21883

- Bishop, N., & Woodman, P. (2000). ATPase-defective Mammalian VPS4 Localizes to Aberrant Endosomes and Impairs Cholesterol Trafficking. *Molecular Biology of the Cell*, *11*(1), 227–239. doi:10.1091/mbc.11.1.227
- Bissonette, G. B., & Powell, E. M. (2012). Reversal learning and attentional set-shifting in mice. *Neuropharmacology*, *62*(3), 1168–74. doi:10.1016/j.neuropharm.2011.03.011
- Blokhuis, A. M., Groen, E. J. N., Koppers, M., van den Berg, L. H., & Pasterkamp, R. J. (2013). Protein aggregation in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathologica*, *125*(6), 777–94. doi:10.1007/s00401-013-1125-6
- Bodon, G., Chassefeyre, R., Pernet-Gallay, K., Martinelli, N., Effantin, G., Hulsik, D. L., ... Sadoul, R. (2011). Charged multivesicular body protein 2B (CHMP2B) of the endosomal sorting complex required for transport-III (ESCRT-III) polymerizes into helical structures deforming the plasma membrane. *The Journal of Biological Chemistry*, *286*(46), 40276–86. doi:10.1074/jbc.M111.283671
- Boillée, S., Yamanaka, K., Lobsiger, C. S., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Kassiotis, G., ... Cleveland, D. W. (2006). Onset and progression in inherited ALS determined by motor neurons and microglia. *Science (New York, N.Y.)*, *312*(5778), 1389–92. doi:10.1126/science.1123511
- Bossù, P., Salani, F., Alberici, A., Archetti, S., Bellelli, G., Galimberti, D., ... Borroni, B. (2011). Loss of function mutations in the progranulin gene are related to pro-inflammatory cytokine dysregulation in frontotemporal lobar degeneration patients. *Journal of Neuroinflammation*, *8*, 65. doi:10.1186/1742-2094-8-65
- Brun, A., Liu, X., & Erikson, C. (1995). Synapse loss and gliosis in the molecular layer of the cerebral cortex in Alzheimer's disease and in frontal lobe degeneration. *Neurodegeneration: A Journal for Neurodegenerative Disorders, Neuroprotection, and Neuroregeneration*, *4*(2), 171–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7583681>
- Canton, T., Pratt, J., Stutzmann, J. M., Imperato, A., & Boireau, A. (1998). Glutamate uptake is decreased tardively in the spinal cord of FALS mice. *Neuroreport*, *9*(5), 775–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9579663>
- Caroni, P. (1997). Overexpression of growth-associated proteins in the neurons of adult transgenic mice. *Journal of Neuroscience Methods*, *71*(1), 3–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9125370>
- Chakkalakal, J. V., Nishimune, H., Ruas, J. L., Spiegelman, B. M., & Sanes, J. R. (2010). Retrograde influence of muscle fibers on their innervation revealed by a novel marker for slow motoneurons. *Development (Cambridge, England)*, *137*(20), 3489–99. doi:10.1242/dev.053348
- Chiò, A., Logroscino, G., Traynor, B. J., Collins, J., Simeone, J. C., Goldstein, L. A., & White, L. A. (2013). Global epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review of the published literature. *Neuroepidemiology*, *41*(2), 118–30. doi:10.1159/000351153
- Cook, C., Dunmore, J. H., Murray, M. E., Scheffel, K., Shukoor, N., Tong, J., ... Fryer, J. D. (2014). Severe amygdala dysfunction in a MAPT transgenic mouse model of frontotemporal dementia. *Neurobiology of Aging*, *35*(7), 1769–77. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2013.12.023
- Cox, L. E., Ferraiuolo, L., Goodall, E. F., Heath, P. R., Higginbottom, A., Mortiboys, H., ... Shaw, P. J. (2010). Mutations in CHMP2B in lower motor neuron predominant amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *PLoS One*, *5*(3), e9872. doi:10.1371/journal.pone.0009872
- Cox, P. A., & Sacks, O. W. (2002). Cycad neurotoxins, consumption of flying foxes, and ALS-PDC disease in Guam. *Neurology*, *58*(6), 956–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11914415>

- Custer, S. K., Neumann, M., Lu, H., Wright, A. C., & Taylor, J. P. (2010). Transgenic mice expressing mutant forms VCP/p97 recapitulate the full spectrum of IBMPFD including degeneration in muscle, brain and bone. *Human Molecular Genetics*, *19*(9), 1741–55. doi:10.1093/hmg/ddq050
- De Carvalho, M., Dengler, R., Eisen, A., England, J. D., Kaji, R., Kimura, J., ... Swash, M. (2008). Electrodiagnostic criteria for diagnosis of ALS. *Clinical Neurophysiology: Official Journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology*, *119*(3), 497–503. doi:10.1016/j.clinph.2007.09.143
- De Souza, L. C., Chupin, M., Bertoux, M., Lehericy, S., Dubois, B., Lamari, F., ... Sarazin, M. (2013). Is hippocampal volume a good marker to differentiate Alzheimer's disease from frontotemporal dementia? *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, *36*(1), 57–66. doi:10.3233/JAD-122293
- Deng, H.-X., Chen, W., Hong, S.-T., Boycott, K. M., Gorrie, G. H., Siddique, N., ... Siddique, T. (2011). Mutations in UBQLN2 cause dominant X-linked juvenile and adult-onset ALS and ALS/dementia. *Nature*, *477*(7363), 211–5. doi:10.1038/nature10353
- Dormann, D., & Haass, C. (2013). Fused in sarcoma (FUS): an oncogene goes awry in neurodegeneration. *Molecular and Cellular Neurosciences*, *56*, 475–86. doi:10.1016/j.mcn.2013.03.006
- Dupuis, L., & Echaniz-Laguna, A. (2010). Skeletal Muscle in Motor Neuron Diseases: Therapeutic Target and Delivery Route for Potential Treatments. *Current Drug Targets*. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20594176>
- Dupuis, L., Gonzalez de Aguilar, J.-L., Echaniz-Laguna, A., Eschbach, J., Rene, F., Oudart, H., ... Loeffler, J.-P. (2009). Muscle mitochondrial uncoupling dismantles neuromuscular junction and triggers distal degeneration of motor neurons. *PloS One*, *4*(4), e5390. doi:10.1371/journal.pone.0005390
- Egashira, N., Iwasaki, K., Takashima, A., Watanabe, T., Kawabe, H., Matsuda, T., ... Fujiwara, M. (2005). Altered depression-related behavior and neurochemical changes in serotonergic neurons in mutant R406W human tau transgenic mice. *Brain Research*, *1059*(1), 7–12. doi:10.1016/j.brainres.2005.08.004
- Engelhardt, J. I., Tajti, J., & Appel, S. H. (1993). Lymphocytic infiltrates in the spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *Archives of Neurology*, *50*(1), 30–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8093428>
- Fader, C. M., & Colombo, M. I. (2009). Autophagy and multivesicular bodies: two closely related partners. *Cell Death and Differentiation*, *16*(1), 70–8. doi:10.1038/cdd.2008.168
- Farg, M. A., Sundaramoorthy, V., Sultana, J. M., Yang, S., Atkinson, R. A. K., Levina, V., ... Atkin, J. D. (2014). C9ORF72, implicated in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia, regulates endosomal trafficking. *Human Molecular Genetics*, *23*(13), 3579–95. doi:10.1093/hmg/ddu068
- Filiano, A. J., Martens, L. H., Young, A. H., Warmus, B. A., Zhou, P., Diaz-Ramirez, G., ... Roberson, E. D. (2013). Dissociation of frontotemporal dementia-related deficits and neuroinflammation in progranulin haploinsufficient mice. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *33*(12), 5352–61. doi:10.1523/JNEUROSCI.6103-11.2013
- Filimonenko, M., Stuffers, S., Raiborg, C., Yamamoto, A., Malerød, L., Fisher, E. M. C., ... Simonsen, A. (2007). Functional multivesicular bodies are required for autophagic clearance of protein aggregates associated with neurodegenerative disease. *The Journal of Cell Biology*, *179*(3), 485–500. doi:10.1083/jcb.200702115
- Fischer, L. R., Culver, D. G., Tennant, P., Davis, A. A., Wang, M., Castellano-Sanchez, A., ... Glass, J. D. (2004). Amyotrophic lateral sclerosis is a distal axonopathy: evidence in mice and man. *Experimental*

Neurology, 185(2), 232–240. Retrieved from
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014488603004795>

- Forman, M. S., Lal, D., Zhang, B., Dabir, D. V., Swanson, E., Lee, V. M.-Y., & Trojanowski, J. Q. (2005). Transgenic mouse model of tau pathology in astrocytes leading to nervous system degeneration. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 25(14), 3539–50. doi:10.1523/JNEUROSCI.0081-05.2005
- Frey, D., Schneider, C., Xu, L., Borg, J., Spooren, W., & Caroni, P. (2000). Early and selective loss of neuromuscular synapse subtypes with low sprouting competence in motoneuron diseases. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 20(7), 2534–42. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10729333>
- Funk, K. E., Mrak, R. E., & Kuret, J. (2011). Granulovacuolar degeneration (GVD) bodies of Alzheimer's disease (AD) resemble late-stage autophagic organelles. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 37(3), 295–306. doi:10.1111/j.1365-2990.2010.01135.x
- Ghazi-Noori, S., Froud, K. E., Mizielińska, S., Powell, C., Smidak, M., Fernandez de Marco, M., ... Isaacs, A. M. (2012). Progressive neuronal inclusion formation and axonal degeneration in CHMP2B mutant transgenic mice. *Brain: A Journal of Neurology*, 135(Pt 3), 819–32. doi:10.1093/brain/aws006
- Ghoshal, N., Dearborn, J. T., Wozniak, D. F., & Cairns, N. J. (2012). Core features of frontotemporal dementia recapitulated in progranulin knockout mice. *Neurobiology of Disease*, 45(1), 395–408. doi:10.1016/j.nbd.2011.08.029
- Gorno-Tempini, M. L., Dronkers, N. F., Rankin, K. P., Ogar, J. M., Phengrasamy, L., Rosen, H. J., ... Miller, B. L. (2004). Cognition and anatomy in three variants of primary progressive aphasia. *Annals of Neurology*, 55(3), 335–46. doi:10.1002/ana.10825
- Gould, T. W., Buss, R. R., Vinsant, S., Prevette, D., Sun, W., Knudson, C. M., ... Oppenheim, R. W. (2006). Complete dissociation of motor neuron death from motor dysfunction by Bax deletion in a mouse model of ALS. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 26(34), 8774–86. doi:10.1523/JNEUROSCI.2315-06.2006
- Graffmo, K. S., Forsberg, K., Bergh, J., Birve, A., Zetterström, P., Andersen, P. M., ... Brännström, T. (2013). Expression of wild-type human superoxide dismutase-1 in mice causes amyotrophic lateral sclerosis. *Human Molecular Genetics*, 22(1), 51–60. doi:10.1093/hmg/ddr399
- Guizetti, J., Schermelleh, L., Mäntler, J., Maar, S., Poser, I., Leonhardt, H., ... Gerlich, D. W. (2011). Cortical constriction during abscission involves helices of ESCRT-III-dependent filaments. *Science (New York, N.Y.)*, 331(6024), 1616–20. doi:10.1126/science.1201847
- Gurney, M. E., Pu, H., Chiu, A. Y., Dal Canto, M. C., Polchow, C. Y., Alexander, D. D., ... Deng, H. X. (1994). Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science (New York, N.Y.)*, 264(5166), 1772–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8209258>
- Gydesen, S., Brown, J. M., Brun, a, Chakrabarti, L., Gade, a, Johannsen, P., ... Sorensen, S. a. (2002). Chromosome 3 linked frontotemporal dementia (FTD-3). *Neurology*, 59(10), 1585–94. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12451202>
- Haidet-Phillips, A. M., Hester, M. E., Miranda, C. J., Meyer, K., Braun, L., Frakes, A., ... Kaspar, B. K. (2011). Astrocytes from familial and sporadic ALS patients are toxic to motor neurons. *Nature Biotechnology*, 29(9), 824–8. doi:10.1038/nbt.1957

- Hanson, P. I., Roth, R., Lin, Y., & Heuser, J. E. (2008). Plasma membrane deformation by circular arrays of ESCRT-III protein filaments. *The Journal of Cell Biology*, *180*(2), 389–402. doi:10.1083/jcb.200707031
- Hara, T., Nakamura, K., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakahara, Y., Suzuki-Migishima, R., ... Mizushima, N. (2006). Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature*, *441*(7095), 885–9. doi:10.1038/nature04724
- Harciarek, M., & Cosentino, S. (2013). Language, executive function and social cognition in the diagnosis of frontotemporal dementia syndromes. *International Review of Psychiatry (Abingdon, England)*, *25*(2), 178–96. doi:10.3109/09540261.2013.763340
- Heiman-Patterson, T. D., Sher, R. B., Blankenhorn, E. A., Alexander, G., Deitch, J. S., Kunst, C. B., ... Cox, G. (2011). Effect of genetic background on phenotype variability in transgenic mouse models of amyotrophic lateral sclerosis: a window of opportunity in the search for genetic modifiers. *Amyotrophic Lateral Sclerosis : Official Publication of the World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron Diseases*, *12*(2), 79–86. doi:10.3109/17482968.2010.550626
- Henne, W. M., Buchkovich, N. J., & Emr, S. D. (2011). The ESCRT pathway. *Developmental Cell*, *21*(1), 77–91. doi:10.1016/j.devcel.2011.05.015
- Henne, W. M., Buchkovich, N. J., Zhao, Y., & Emr, S. D. (2012). The endosomal sorting complex ESCRT-II mediates the assembly and architecture of ESCRT-III helices. *Cell*, *151*(2), 356–71. doi:10.1016/j.cell.2012.08.039
- Hicks, G. G., Singh, N., Nashabi, A., Mai, S., Bozek, G., Klewes, L., ... Ruley, H. E. (2000). Fus deficiency in mice results in defective B-lymphocyte development and activation, high levels of chromosomal instability and perinatal death. *Nature Genetics*, *24*(2), 175–9. doi:10.1038/72842
- Higuchi, M., Zhang, B., Forman, M. S., Yoshiyama, Y., Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M.-Y. (2005). Axonal degeneration induced by targeted expression of mutant human tau in oligodendrocytes of transgenic mice that model glial tauopathies. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *25*(41), 9434–43. doi:10.1523/JNEUROSCI.2691-05.2005
- Holm, I. E., Englund, E., Mackenzie, I. R. A., Johannsen, P., & Isaacs, A. M. (2007). A reassessment of the neuropathology of frontotemporal dementia linked to chromosome 3. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, *66*(10), 884–91. doi:10.1097/nen.0b013e3181567f02
- Huang, C., Tong, J., Bi, F., Zhou, H., & Xia, X.-G. (2012). Mutant TDP-43 in motor neurons promotes the onset and progression of ALS in rats. *The Journal of Clinical Investigation*, *122*(1), 107–18. doi:10.1172/JCI59130
- Hutton, M., Lendon, C. L., Rizzu, P., Baker, M., Froelich, S., Houlden, H., ... Heutink, P. (1998). Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature*, *393*(6686), 702–5. doi:10.1038/31508
- Isaacs, A. M., Johannsen, P., Holm, I., & Nielsen, J. E. (2011). Frontotemporal dementia caused by CHMP2B mutations. *Current Alzheimer Research*, *8*(3), 246–51. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3182073&tool=pmcentrez&rendertyp=e=abstract>
- Jaarsma, D., Teuling, E., Haasdijk, E. D., De Zeeuw, C. I., & Hoogenraad, C. C. (2008). Neuron-specific expression of mutant superoxide dismutase is sufficient to induce amyotrophic lateral sclerosis in transgenic mice. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *28*(9), 2075–88. doi:10.1523/JNEUROSCI.5258-07.2008

- Johns, E. K., Phillips, N. A., Belleville, S., Goupil, D., Babins, L., Kelner, N., ... Chertkow, H. (2009). Executive functions in frontotemporal dementia and Lewy body dementia. *Neuropsychology*, *23*(6), 765–77. doi:10.1037/a0016792
- Johnson, J. O., Mandrioli, J., Benatar, M., Abramzon, Y., Van Deerlin, V. M., Trojanowski, J. Q., ... Traynor, B. J. (2010). Exome sequencing reveals VCP mutations as a cause of familial ALS. *Neuron*, *68*(5), 857–64. doi:10.1016/j.neuron.2010.11.036
- Kawamata, T., Akiyama, H., Yamada, T., & McGeer, P. L. (1992). Immunologic reactions in amyotrophic lateral sclerosis brain and spinal cord tissue. *The American Journal of Pathology*, *140*(3), 691–707. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1886170&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Kayasuga, Y., Chiba, S., Suzuki, M., Kikusui, T., Matsuwaki, T., Yamanouchi, K., ... Nishihara, M. (2007). Alteration of behavioural phenotype in mice by targeted disruption of the progranulin gene. *Behavioural Brain Research*, *185*(2), 110–8. doi:10.1016/j.bbr.2007.07.020
- Kersaitis, C., Halliday, G. M., & Kril, J. J. (2004). Regional and cellular pathology in frontotemporal dementia: relationship to stage of disease in cases with and without Pick bodies. *Acta Neuropathologica*, *108*(6), 515–23. doi:10.1007/s00401-004-0917-0
- Klanker, M., Feenstra, M., & Denys, D. (2013). Dopaminergic control of cognitive flexibility in humans and animals. *Frontiers in Neuroscience*, *7*, 201. doi:10.3389/fnins.2013.00201
- Knippenberg, S., Thau, N., Dengler, R., & Petri, S. (2010). Significance of behavioural tests in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Behavioural Brain Research*, *213*(1), 82–7. doi:10.1016/j.bbr.2010.04.042
- Kraemer, B. C., Zhang, B., Leverenz, J. B., Thomas, J. H., Trojanowski, J. Q., & Schellenberg, G. D. (2003). Neurodegeneration and defective neurotransmission in a *Caenorhabditis elegans* model of tauopathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(17), 9980–5. doi:10.1073/pnas.1533448100
- Kurashige, T., Takahashi, T., Yamazaki, Y., Hiji, M., Izumi, Y., Yamawaki, T., & Matsumoto, M. (2012). Localization of CHMP2B-immunoreactivity in the brainstem of Lewy body disease. *Neuropathology: Official Journal of the Japanese Society of Neuropathology*. doi:10.1111/j.1440-1789.2012.01346.x
- Laakso, M. P., Frisoni, G. B., Könönen, M., Mikkonen, M., Beltramello, A., Geroldi, C., ... Aronen, H. J. (2000). Hippocampus and entorhinal cortex in frontotemporal dementia and Alzheimer's disease: a morphometric MRI study. *Biological Psychiatry*, *47*(12), 1056–1063. doi:10.1016/S0006-3223(99)00306-6
- Lagier-Tourenne, C., Polymenidou, M., & Cleveland, D. W. (2010). TDP-43 and FUS/TLS: emerging roles in RNA processing and neurodegeneration. *Human Molecular Genetics*, *19*(R1), R46–64. doi:10.1093/hmg/ddq137
- Lebert, F., Stekke, W., Hasenbroekx, C., & Pasquier, F. (2004). Frontotemporal dementia: a randomised, controlled trial with trazodone. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*, *17*(4), 355–9. doi:10.1159/000077171
- Lee, J.-A., Beigneux, A., Ahmad, S. T., Young, S. G., & Gao, F.-B. (2007). ESCRT-III dysfunction causes autophagosome accumulation and neurodegeneration. *Current Biology: CB*, *17*(18), 1561–7. doi:10.1016/j.cub.2007.07.029
- Levenga, J., Krishnamurthy, P., Rajamohamedsait, H., Wong, H., Franke, T. F., Cain, P., ... Hoeffler, C. a. (2013). Tau pathology induces loss of GABAergic interneurons leading to altered synaptic plasticity

- and behavioral impairments. *Acta Neuropathologica Communications*, 1(1), 34. doi:10.1186/2051-5960-1-34
- Lewis, J., McGowan, E., Rockwood, J., Melrose, H., Nacharaju, P., Van, M., ... Hutton, M. (2000). Neurofibrillary tangles, amyotrophy and progressive motor disturbance in mice expressing mutant (P301L) tau protein. *Nature Genetics*, 26(1), 127. doi:10.1038/79109
- Lindquist, S. G., Braedgaard, H., Svenstrup, K., Isaacs, A. M., & Nielsen, J. E. (2008). Frontotemporal dementia linked to chromosome 3 (FTD-3)--current concepts and the detection of a previously unknown branch of the Danish FTD-3 family. *European Journal of Neurology: The Official Journal of the European Federation of Neurological Societies*, 15(7), 667–70. doi:10.1111/j.1468-1331.2008.02144.x
- Ling, S.-C., Polymenidou, M., & Cleveland, D. W. (2013). Converging mechanisms in ALS and FTD: disrupted RNA and protein homeostasis. *Neuron*, 79(3), 416–38. doi:10.1016/j.neuron.2013.07.033
- Lino, M. M., Schneider, C., & Caroni, P. (2002). Accumulation of SOD1 mutants in postnatal motoneurons does not cause motoneuron pathology or motoneuron disease. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 22(12), 4825–32. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12077179>
- Lu, Y., Ferris, J., & Gao, F.-B. (2009). Frontotemporal dementia and amyotrophic lateral sclerosis-associated disease protein TDP-43 promotes dendritic branching. *Molecular Brain*, 2, 30. doi:10.1186/1756-6606-2-30
- Lunau, L., Mouridsen, K., Rodell, A., Ostergaard, L., Nielsen, J. E., Isaacs, A., & Johannsen, P. (2012). Presymptomatic cerebral blood flow changes in CHMP2B mutation carriers of familial frontotemporal dementia (FTD-3), measured with MRI. *BMJ Open*, 2(2), e000368. doi:10.1136/bmjopen-2011-000368
- Mackenzie, I. R., Rademakers, R., & Neumann, M. (2010). TDP-43 and FUS in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *The Lancet. Neurology*, 9(10), 995–1007. doi:10.1016/S1474-4422(10)70195-2
- Mann, D. M., South, P. W., Snowden, J. S., & Neary, D. (1993). Dementia of frontal lobe type: neuropathology and immunohistochemistry. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 56(6), 605–14. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=489608&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Marchetto, M. C. N., Muotri, A. R., Mu, Y., Smith, A. M., Cezar, G. G., & Gage, F. H. (2008). Non-cell-autonomous effect of human SOD1 G37R astrocytes on motor neurons derived from human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*, 3(6), 649–57. doi:10.1016/j.stem.2008.10.001
- Martin, J. A., Craft, D. K., Su, J. H., Kim, R. C., & Cotman, C. W. (n.d.). Astrocytes degenerate in frontotemporal dementia: possible relation to hypoperfusion. *Neurobiology of Aging*, 22(2), 195–207. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11182469>
- McGeer, P. L., & McGeer, E. G. (2002). Inflammatory processes in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle & Nerve*, 26(4), 459–70. doi:10.1002/mus.10191
- McGoldrick, P., Joyce, P. I., Fisher, E. M. C., & Greensmith, L. (2013). Rodent models of amyotrophic lateral sclerosis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1832(9), 1421–36. doi:10.1016/j.bbadis.2013.03.012
- Miller, R. G., Mitchell, J. D., & Moore, D. H. (2012). Riluzole for amyotrophic lateral sclerosis (ALS)/motor neuron disease (MND). *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 3, CD001447. doi:10.1002/14651858.CD001447.pub3

- Mitchell, J. C., McGoldrick, P., Vance, C., Hortobagyi, T., Sreedharan, J., Rogelj, B., ... Shaw, C. E. (2013). Overexpression of human wild-type FUS causes progressive motor neuron degeneration in an age- and dose-dependent fashion. *Acta Neuropathologica*, *125*(2), 273–88. doi:10.1007/s00401-012-1043-z
- Miyasaka, T., Ding, Z., Gengyo-Ando, K., Oue, M., Yamaguchi, H., Mitani, S., & Ihara, Y. (2005). Progressive neurodegeneration in *C. elegans* model of tauopathy. *Neurobiology of Disease*, *20*(2), 372–83. doi:10.1016/j.nbd.2005.03.017
- Mori, K., Weng, S.-M., Arzberger, T., May, S., Rentzsch, K., Kremmer, E., ... Edbauer, D. (2013). The C9orf72 GGGGCC repeat is translated into aggregating dipeptide-repeat proteins in FTL/ALS. *Science (New York, N.Y.)*, *339*(6125), 1335–8. doi:10.1126/science.1232927
- MULDER, D. W., KURLAND, L. T., & IRIARTE, L. L. (1954). Neurologic diseases on the island of Guam. *United States Armed Forces Medical Journal*, *5*(12), 1724–39. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13217119>
- Münch, C., Sedlmeier, R., Meyer, T., Homberg, V., Sperfeld, A. D., Kurt, A., ... Ludolph, A. C. (2004). Point mutations of the p150 subunit of dynactin (DCTN1) gene in ALS. *Neurology*, *63*(4), 724–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15326253>
- Murayama, S., Inoue, K., Kawakami, H., Bouldin, T. W., & Suzuki, K. (1991). A unique pattern of astrocytosis in the primary motor area in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathologica*, *82*(6), 456–61. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1785258>
- Nagai, M., Re, D. B., Nagata, T., Chalazonitis, A., Jessell, T. M., Wichterle, H., & Przedborski, S. (2007). Astrocytes expressing ALS-linked mutated SOD1 release factors selectively toxic to motor neurons. *Nature Neuroscience*, *10*(5), 615–22. doi:10.1038/nn1876
- Neumann, M., Sampathu, D. M., Kwong, L. K., Truax, A. C., Micsenyi, M. C., Chou, T. T., ... Lee, V. M.-Y. (2006). Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science (New York, N.Y.)*, *314*(5796), 130–3. doi:10.1126/science.1134108
- Nguyen, A. D., Nguyen, T. A., Martens, L. H., Mitic, L. L., & Farese, R. V. (2013). Progranulin: at the interface of neurodegenerative and metabolic diseases. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, *24*(12), 597–606. doi:10.1016/j.tem.2013.08.003
- Nimchinsky, E. A., Vogt, B. A., Morrison, J. H., & Hof, P. R. (1995). Spindle neurons of the human anterior cingulate cortex. *The Journal of Comparative Neurology*, *355*(1), 27–37. doi:10.1002/cne.903550106
- Okamoto, K., Hirai, S., Shoji, M., Senoh, Y., & Yamazaki, T. (1990). Axonal swellings in the corticospinal tracts in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathologica*, *80*(2), 222–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2202191>
- Panda, D., Samuel, J. C., Massie, M., Feinstein, S. C., & Wilson, L. (2003). Differential regulation of microtubule dynamics by three- and four-repeat tau: implications for the onset of neurodegenerative disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(16), 9548–53. doi:10.1073/pnas.1633508100
- Park, M., Salgado, J. M., Ostroff, L., Helton, T. D., Robinson, C. G., Harris, K. M., & Ehlers, M. D. (2006). Plasticity-induced growth of dendritic spines by exocytic trafficking from recycling endosomes. *Neuron*, *52*(5), 817–30. doi:10.1016/j.neuron.2006.09.040
- Parkinson, N., Ince, P. G., Smith, M. O., Highley, R., Skibinski, G., Andersen, P. M., ... Fisher, E. M. C. (2006). ALS phenotypes with mutations in CHMP2B (charged multivesicular body protein 2B). *Neurology*, *67*(6), 1074–7. doi:10.1212/01.wnl.0000231510.89311.8b

- Peled-Kamar, M., Lotem, J., Wirguin, I., Weiner, L., Hermalin, A., & Groner, Y. (1997). Oxidative stress mediates impairment of muscle function in transgenic mice with elevated level of wild-type Cu/Zn superoxide dismutase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *94*(8), 3883–7. Retrieved from <http://www.pnas.org/content/94/8/3883.full>
- Petkau, T. L., Neal, S. J., Milnerwood, A., Mew, A., Hill, A. M., Orban, P., ... Leavitt, B. R. (2012). Synaptic dysfunction in progranulin-deficient mice. *Neurobiology of Disease*, *45*(2), 711–22. doi:10.1016/j.nbd.2011.10.016
- Piguot, O. (2011). Eating disturbance in behavioural-variant frontotemporal dementia. *Journal of Molecular Neuroscience : MN*, *45*(3), 589–93. doi:10.1007/s12031-011-9547-x
- Pose, M., Cetekovich, M., Gleichgerricht, E., Ibáñez, A., Torralva, T., & Manes, F. (2013). The overlap of symptomatic dimensions between frontotemporal dementia and several psychiatric disorders that appear in late adulthood. *International Review of Psychiatry (Abingdon, England)*, *25*(2), 159–67. doi:10.3109/09540261.2013.769939
- Possin, K. L., Feigenbaum, D., Rankin, K. P., Smith, G. E., Boxer, A. L., Wood, K., ... Kramer, J. H. (2013). Dissociable executive functions in behavioral variant frontotemporal and Alzheimer dementias. *Neurology*, *80*(24), 2180–5. doi:10.1212/WNL.0b013e318296e940
- Pramatarova, A., Laganière, J., Roussel, J., Brisebois, K., & Rouleau, G. A. (2001). Neuron-specific expression of mutant superoxide dismutase 1 in transgenic mice does not lead to motor impairment. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *21*(10), 3369–74. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11331366>
- Prioni, S., Fetoni, V., Barocco, F., Redaelli, V., Falcone, C., Soliveri, P., ... Girotti, F. (2012). Stereotypic behaviors in degenerative dementias. *Journal of Neurology*, *259*(11), 2452–9. doi:10.1007/s00415-012-6528-0
- Rademakers, R., Neumann, M., & Mackenzie, I. R. (2012). Advances in understanding the molecular basis of frontotemporal dementia. *Nature Reviews. Neurology*, *8*(8), 423–34. doi:10.1038/nrneurol.2012.117
- Rascovsky, K., Hodges, J. R., Knopman, D., Mendez, M. F., Kramer, J. H., Neuhaus, J., ... Miller, B. L. (2011). Sensitivity of revised diagnostic criteria for the behavioural variant of frontotemporal dementia. *Brain : A Journal of Neurology*, *134*(Pt 9), 2456–77. doi:10.1093/brain/awr179
- Ratnavalli, E., Brayne, C., Dawson, K., & Hodges, J. R. (2002). The prevalence of frontotemporal dementia. *Neurology*, *58*(11), 1615–21. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12058088>
- Rea, S. L., Majcher, V., Searle, M. S., & Layfield, R. (2014). SQSTM1 mutations--bridging Paget disease of bone and ALS/FTLD. *Experimental Cell Research*, *325*(1), 27–37. doi:10.1016/j.yexcr.2014.01.020
- Reaume, A. G., Elliott, J. L., Hoffman, E. K., Kowall, N. W., Ferrante, R. J., Siwek, D. F., ... Snider, W. D. (1996). Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. *Nature Genetics*, *13*(1), 43–7. doi:10.1038/ng0596-43
- Renton, A. E., Chiò, A., & Traynor, B. J. (2014). State of play in amyotrophic lateral sclerosis genetics. *Nature Neuroscience*, *17*(1), 17–23. doi:10.1038/nn.3584
- Ringholz, G. M., Appel, S. H., Bradshaw, M., Cooke, N. A., Mosnik, D. M., & Schulz, P. E. (2005). Prevalence and patterns of cognitive impairment in sporadic ALS. *Neurology*, *65*(4), 586–90. doi:10.1212/01.wnl.0000172911.39167.b6
- Rizzu, P., van Mil, S. E., Anar, B., Rosso, S. M., Donker Kaat, L., Heutink, P., & van Swieten, J. C. (2006). CHMP2B mutations are not a cause of dementia in Dutch patients with familial and sporadic frontotemporal dementia. *American Journal of Medical Genetics. Part B, Neuropsychiatric Genetics* :

The Official Publication of the International Society of Psychiatric Genetics, 141B(8), 944–6.
doi:10.1002/ajmg.b.30410

- Roberson, E. D. (2012). Mouse models of frontotemporal dementia. *Annals of Neurology*, 72(6), 837–49.
doi:10.1002/ana.23722
- Rodriguez-Ortiz, C. J., Hoshino, H., Cheng, D., Liu-Yescevit, L., Blurton-Jones, M., Wolozin, B., ... Kitazawa, M. (2013). Neuronal-specific overexpression of a mutant valosin-containing protein associated with IBMPFD promotes aberrant ubiquitin and TDP-43 accumulation and cognitive dysfunction in transgenic mice. *The American Journal of Pathology*, 183(2), 504–15.
doi:10.1016/j.ajpath.2013.04.014
- Rohrer, J. D., Ahsan, R. L., Isaacs, A. M., Nielsen, J. E., Ostergaard, L., Scahill, R., ... Johannsen, P. (2009). Presymptomatic generalized brain atrophy in frontotemporal dementia caused by CHMP2B mutation. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*, 27(2), 182–6. doi:10.1159/000200466
- Rona-Voros, K., Eschbach, J., Vernay, A., Wiesner, D., Schwalenstocker, B., Geniquet, P., ... Dupuis, L. (2013). Full-length PGC-1 α salvages the phenotype of a mouse model of human neuropathy through mitochondrial proliferation. *Human Molecular Genetics*. doi:10.1093/hmg/ddt359
- Rosen, D. R., Siddique, T., Patterson, D., Figlewicz, D. A., Sapp, P., Hentati, A., ... Deng, H. X. (1993). Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*, 362(6415), 59–62. doi:10.1038/362059a0
- Rothenberg, C., Srinivasan, D., Mah, L., Kaushik, S., Peterhoff, C. M., Ugolino, J., ... Monteiro, M. J. (2010). Ubiquilin functions in autophagy and is degraded by chaperone-mediated autophagy. *Human Molecular Genetics*, 19(16), 3219–32. doi:10.1093/hmg/ddq231
- Rotunno, M. S., & Bosco, D. A. (2013). An emerging role for misfolded wild-type SOD1 in sporadic ALS pathogenesis. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 7, 253. doi:10.3389/fncel.2013.00253
- Rouaux, C., Panteleeva, I., René, F., Gonzalez de Aguilar, J.-L., Echaniz-Laguna, A., Dupuis, L., ... Loeffler, J.-P. (2007). Sodium valproate exerts neuroprotective effects in vivo through CREB-binding protein-dependent mechanisms but does not improve survival in an amyotrophic lateral sclerosis mouse model. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 27(21), 5535–45. doi:10.1523/JNEUROSCI.1139-07.2007
- Rusten, T. E., Filimonenko, M., Rodahl, L. M., Stenmark, H., & Simonsen, A. (n.d.). ESCRTing autophagic clearance of aggregating proteins. *Autophagy*, 4(2), 233–236. Retrieved from <https://www-landesbioscience-com.gate2.inist.fr/journals/autophagy/article/5396/?nocache=1353517849>
- Rusten, T. E., & Simonsen, A. (2008). ESCRT functions in autophagy and associated disease. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 7(9), 1166–72. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18418046>
- Santillo, A. F., & Englund, E. (2014). Greater loss of von Economo neurons than loss of layer II and III neurons in behavioral variant frontotemporal dementia. *American Journal of Neurodegenerative Disease*, 3(2), 64–71. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4162587&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Santillo, A. F., Nilsson, C., & Englund, E. (2013). von Economo neurones are selectively targeted in frontotemporal dementia. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 39(5), 572–9.
doi:10.1111/nan.12021

- Sasaki, S., & Iwata, M. (2007). Mitochondrial alterations in the spinal cord of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 66(1), 10–6. doi:10.1097/nen.0b013e31802c396b
- Sasaki, S., & Maruyama, S. (1992). Increase in diameter of the axonal initial segment is an early change in amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of the Neurological Sciences*, 110(1-2), 114–120. doi:10.1016/0022-510X(92)90017-F
- Schofield, E., Kersaitis, C., Shepherd, C. E., Kril, J. J., & Halliday, G. M. (2003). Severity of gliosis in Pick's disease and frontotemporal lobar degeneration: tau-positive glia differentiate these disorders. *Brain : A Journal of Neurology*, 126(Pt 4), 827–40. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12615642>
- Schroeter, M. L., Raczka, K., Neumann, J., & Yves von Cramon, D. (2007). Towards a nosology for frontotemporal lobar degenerations—a meta-analysis involving 267 subjects. *NeuroImage*, 36(3), 497–510. doi:10.1016/j.neuroimage.2007.03.024
- Seeley, W. W., Carlin, D. A., Allman, J. M., Macedo, M. N., Bush, C., Miller, B. L., & Dearmond, S. J. (2006). Early frontotemporal dementia targets neurons unique to apes and humans. *Annals of Neurology*, 60(6), 660–7. doi:10.1002/ana.21055
- Shan, X., Chiang, P.-M., Price, D. L., & Wong, P. C. (2010). Altered distributions of Gemini of coiled bodies and mitochondria in motor neurons of TDP-43 transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(37), 16325–30. doi:10.1073/pnas.1003459107
- Sjögren, M., Folkesson, S., Blennow, K., & Tarkowski, E. (2004). Increased intrathecal inflammatory activity in frontotemporal dementia: pathophysiological implications. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 75(8), 1107–11. doi:10.1136/jnnp.2003.019422
- Skibinski, G., Parkinson, N. J., Brown, J. M., Chakrabarti, L., Lloyd, S. L., Hummerich, H., ... Collinge, J. (2005). Mutations in the endosomal ESCRTIII-complex subunit CHMP2B in frontotemporal dementia. *Nature Genetics*, 37(8), 806–8. doi:10.1038/ng1609
- Stallings, N. R., Puttapparthi, K., Luther, C. M., Burns, D. K., & Elliott, J. L. (2010). Progressive motor weakness in transgenic mice expressing human TDP-43. *Neurobiology of Disease*, 40(2), 404–14. doi:10.1016/j.nbd.2010.06.017
- Stokholm, J., Teasdale, T. W., Johannsen, P., Nielsen, J. E., Nielsen, T. T., Isaacs, A., ... Gade, A. (2013). Cognitive impairment in the preclinical stage of dementia in FTD-3 CHMP2B mutation carriers: a longitudinal prospective study. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 84(2), 170–6. doi:10.1136/jnnp-2012-303813
- Su, J. H., Nichol, K. E., Sitch, T., Sheu, P., Chubb, C., Miller, B. L., ... Cotman, C. W. (2000). DNA damage and activated caspase-3 expression in neurons and astrocytes: evidence for apoptosis in frontotemporal dementia. *Experimental Neurology*, 163(1), 9–19. doi:10.1006/exnr.2000.7340
- Swarup, V., Phaneuf, D., Bareil, C., Robertson, J., Rouleau, G. A., Kriz, J., & Julien, J.-P. (2011). Pathological hallmarks of amyotrophic lateral sclerosis/frontotemporal lobar degeneration in transgenic mice produced with TDP-43 genomic fragments. *Brain : A Journal of Neurology*, 134(Pt 9), 2610–26. doi:10.1093/brain/awr159
- Tanikawa, S., Mori, F., Tanji, K., Kakita, A., Takahashi, H., & Wakabayashi, K. (2012). Endosomal sorting related protein CHMP2B is localized in Lewy bodies and glial cytoplasmic inclusions in α -synucleinopathy. *Neuroscience Letters*, 527(1), 16–21. doi:10.1016/j.neulet.2012.08.035

- Tartaglia, M. C., Zhang, Y., Racine, C., Laluz, V., Neuhaus, J., Chao, L., ... Weiner, M. (2012). Executive dysfunction in frontotemporal dementia is related to abnormalities in frontal white matter tracts. *Journal of Neurology*, 259(6), 1071–80. doi:10.1007/s00415-011-6300-x
- Tashiro, Y., Urushitani, M., Inoue, H., Koike, M., Uchiyama, Y., Komatsu, M., ... Takahashi, R. (2012). Motor neuron-specific disruption of proteasomes, but not autophagy, replicates amyotrophic lateral sclerosis. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(51), 42984–94. doi:10.1074/jbc.M112.417600
- Tatebayashi, Y., Miyasaka, T., Chui, D.-H., Akagi, T., Mishima, K., Iwasaki, K., ... Takashima, A. (2002). Tau filament formation and associative memory deficit in aged mice expressing mutant (R406W) human tau. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(21), 13896–901. doi:10.1073/pnas.202205599
- Teo, H., Perisic, O., González, B., & Williams, R. L. (2004). ESCRT-II, an endosome-associated complex required for protein sorting: crystal structure and interactions with ESCRT-III and membranes. *Developmental Cell*, 7(4), 559–69. doi:10.1016/j.devcel.2004.09.003
- Tsai, K.-J., Yang, C.-H., Fang, Y.-H., Cho, K.-H., Chien, W.-L., Wang, W.-T., ... Shen, C.-K. J. (2010). Elevated expression of TDP-43 in the forebrain of mice is sufficient to cause neurological and pathological phenotypes mimicking FTLD-U. *The Journal of Experimental Medicine*, 207(8), 1661–73. doi:10.1084/jem.20092164
- Urwin, H., Authier, A., Nielsen, J. E., Metcalf, D., Powell, C., Froud, K., ... Isaacs, A. M. (2010). Disruption of endocytic trafficking in frontotemporal dementia with CHMP2B mutations. *Human Molecular Genetics*, 19(11), 2228–38. doi:10.1093/hmg/ddq100
- Van Cauter, T., Camon, J., Alvernhe, A., Elduayen, C., Sargolini, F., & Save, E. (2013). Distinct roles of medial and lateral entorhinal cortex in spatial cognition. *Cerebral Cortex (New York, N.Y. : 1991)*, 23(2), 451–9. doi:10.1093/cercor/bhs033
- Van der Zee, J., Urwin, H., Engelborghs, S., Bruyland, M., Vandenberghe, R., Dermaut, B., ... Van Broeckhoven, C. (2008). CHMP2B C-truncating mutations in frontotemporal lobar degeneration are associated with an aberrant endosomal phenotype in vitro. *Human Molecular Genetics*, 17(2), 313–22. doi:10.1093/hmg/ddm309
- Van Eersel, J., Ke, Y. D., Gladbach, A., Bi, M., Götz, J., Kril, J. J., & Ittner, L. M. (2011). Cytoplasmic accumulation and aggregation of TDP-43 upon proteasome inhibition in cultured neurons. *PloS One*, 6(7), e22850. doi:10.1371/journal.pone.0022850
- Verbeeck, C., Deng, Q., Dejesus-Hernandez, M., Taylor, G., Ceballos-Diaz, C., Kocerha, J., ... Kukar, T. (2012). Expression of Fused in sarcoma mutations in mice recapitulates the neuropathology of FUS proteinopathies and provides insight into disease pathogenesis. *Molecular Neurodegeneration*, 7(1), 53. doi:10.1186/1750-1326-7-53
- Vidal, R. L., Matus, S., Bargsted, L., & Hetz, C. (2014). Targeting autophagy in neurodegenerative diseases. *Trends in Pharmacological Sciences*. doi:10.1016/j.tips.2014.09.002
- Vinsant, S., Mansfield, C., Jimenez-Moreno, R., Del Gaizo Moore, V., Yoshikawa, M., Hampton, T. G., ... Milligan, C. (2013). Characterization of early pathogenesis in the SOD1(G93A) mouse model of ALS: part II, results and discussion. *Brain and Behavior*, 3(4), 431–57. doi:10.1002/brb3.142
- Watts, G. D. J., Wymer, J., Kovach, M. J., Mehta, S. G., Mumm, S., Darvish, D., ... Kimonis, V. E. (2004). Inclusion body myopathy associated with Paget disease of bone and frontotemporal dementia is caused by mutant valosin-containing protein. *Nature Genetics*, 36(4), 377–81. doi:10.1038/ng1332
- Wegorzewska, I., Bell, S., Cairns, N. J., Miller, T. M., & Baloh, R. H. (2009). TDP-43 mutant transgenic mice develop features of ALS and frontotemporal lobar degeneration. *Proceedings of the National*

Academy of Sciences of the United States of America, 106(44), 18809–14.
doi:10.1073/pnas.0908767106

- Weydt, P., Hong, S. Y., Kliot, M., & Möller, T. (2003). Assessing disease onset and progression in the SOD1 mouse model of ALS. *Neuroreport*, 14(7), 1051–4. doi:10.1097/01.wnr.0000073685.00308.89
- Whitwell, J. L., Przybelski, S. A., Weigand, S. D., Ivnik, R. J., Vemuri, P., Gunter, J. L., ... Josephs, K. A. (2009). Distinct anatomical subtypes of the behavioural variant of frontotemporal dementia: a cluster analysis study. *Brain : A Journal of Neurology*, 132(Pt 11), 2932–46. doi:10.1093/brain/awp232
- Wils, H., Kleinberger, G., Janssens, J., Pereson, S., Joris, G., Cuijt, I., ... Kumar-Singh, S. (2010). TDP-43 transgenic mice develop spastic paralysis and neuronal inclusions characteristic of ALS and frontotemporal lobar degeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(8), 3858–63. doi:10.1073/pnas.0912417107
- Wilson, D. I. G., Watanabe, S., Milner, H., & Ainge, J. A. (2013). Lateral entorhinal cortex is necessary for associative but not nonassociative recognition memory. *Hippocampus*, 23(12), 1280–90. doi:10.1002/hipo.22165
- Wittmann, C. W., Wszolek, M. F., Shulman, J. M., Salvaterra, P. M., Lewis, J., Hutton, M., & Feany, M. B. (2001). Tauopathy in Drosophila: neurodegeneration without neurofibrillary tangles. *Science (New York, N.Y.)*, 293(5530), 711–4. doi:10.1126/science.1062382
- Wong, M., & Martin, L. J. (2010). Skeletal muscle-restricted expression of human SOD1 causes motor neuron degeneration in transgenic mice. *Human Molecular Genetics*, 19(11), 2284–302. doi:10.1093/hmg/ddq106
- Woolley, J. D., Gorno-Tempini, M.-L., Seeley, W. W., Rankin, K., Lee, S. S., Matthews, B. R., & Miller, B. L. (2007). Binge eating is associated with right orbitofrontal-insular-striatal atrophy in frontotemporal dementia. *Neurology*, 69(14), 1424–33. doi:10.1212/01.wnl.0000277461.06713.23
- Wu, L.-S., Cheng, W.-C., & Shen, C.-K. J. (2012). Targeted depletion of TDP-43 expression in the spinal cord motor neurons leads to the development of amyotrophic lateral sclerosis-like phenotypes in mice. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(33), 27335–44. doi:10.1074/jbc.M112.359000
- Xu, Y.-F., Gendron, T. F., Zhang, Y.-J., Lin, W.-L., D'Alton, S., Sheng, H., ... Petrucelli, L. (2010). Wild-type human TDP-43 expression causes TDP-43 phosphorylation, mitochondrial aggregation, motor deficits, and early mortality in transgenic mice. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 30(32), 10851–9. doi:10.1523/JNEUROSCI.1630-10.2010
- Xu, Y.-F., Zhang, Y.-J., Lin, W.-L., Cao, X., Stetler, C., Dickson, D. W., ... Petrucelli, L. (2011). Expression of mutant TDP-43 induces neuronal dysfunction in transgenic mice. *Molecular Neurodegeneration*, 6(1), 73. doi:10.1186/1750-1326-6-73
- Yamanaka, K., Chun, S. J., Boillee, S., Fujimori-Tonou, N., Yamashita, H., Gutmann, D. H., ... Cleveland, D. W. (2008). Astrocytes as determinants of disease progression in inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Nature Neuroscience*, 11(3), 251–3. doi:10.1038/nn2047
- Yamanaka, K., Sasagawa, Y., & Ogura, T. (2012). Recent advances in p97/VCP/Cdc48 cellular functions. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1823(1), 130–7. doi:10.1016/j.bbamcr.2011.07.001
- Yamazaki, Y., Takahashi, T., Hiji, M., Kurashige, T., Izumi, Y., Yamawaki, T., & Matsumoto, M. (2010). Immunopositivity for ESCRT-III subunit CHMP2B in granulovacuolar degeneration of neurons in the Alzheimer's disease hippocampus. *Neuroscience Letters*, 477(2), 86–90. doi:10.1016/j.neulet.2010.04.038

- Yassine, N., Lazaris, A., Dorner-Ciossek, C., Després, O., Meyer, L., Maitre, M., ... Mathis, C. (2013). Detecting spatial memory deficits beyond blindness in tg2576 Alzheimer mice. *Neurobiology of Aging*, *34*(3), 716–30. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2012.06.016
- Yin, F., Banerjee, R., Thomas, B., Zhou, P., Qian, L., Jia, T., ... Ding, A. (2010). Exaggerated inflammation, impaired host defense, and neuropathology in progranulin-deficient mice. *The Journal of Experimental Medicine*, *207*(1), 117–28. doi:10.1084/jem.20091568
- Yin, F., Dumont, M., Banerjee, R., Ma, Y., Li, H., Lin, M. T., ... Ding, A. (2010). Behavioral deficits and progressive neuropathology in progranulin-deficient mice: a mouse model of frontotemporal dementia. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *24*(12), 4639–47. doi:10.1096/fj.10-161471
- Yin, H. Z., Nalbandian, A., Hsu, C.-I., Li, S., Llewellyn, K. J., Mozaffar, T., ... Weiss, J. H. (2012). Slow development of ALS-like spinal cord pathology in mutant valosin-containing protein gene knock-in mice. *Cell Death & Disease*, *3*(8), e374. doi:10.1038/cddis.2012.115
- Yoshihara, T., Ishigaki, S., Yamamoto, M., Liang, Y., Niwa, J., Takeuchi, H., ... Sobue, G. (2002). Differential expression of inflammation- and apoptosis-related genes in spinal cords of a mutant SOD1 transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neurochemistry*, *80*(1), 158–67. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11796754>
- Yoshiyama, Y., Higuchi, M., Zhang, B., Huang, S.-M., Iwata, N., Saido, T. C., ... Lee, V. M.-Y. (2007). Synapse loss and microglial activation precede tangles in a P301S tauopathy mouse model. *Neuron*, *53*(3), 337–51. doi:10.1016/j.neuron.2007.01.010
- Zhang, B., Tu, P., Abtahian, F., Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M. (1997). Neurofilaments and orthograde transport are reduced in ventral root axons of transgenic mice that express human SOD1 with a G93A mutation. *The Journal of Cell Biology*, *139*(5), 1307–15. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2140205&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Zhou, H., Huang, C., Chen, H., Wang, D., Landel, C. P., Xia, P. Y., ... Xia, X. G. (2010). Transgenic rat model of neurodegeneration caused by mutation in the TDP gene. *PLoS Genetics*, *6*(3), e1000887. doi:10.1371/journal.pgen.1000887
- Zoccolella, S., Beghi, E., Palagano, G., Fraddosio, A., Guerra, V., Samarelli, V., ... Logroscino, G. (2008). Analysis of survival and prognostic factors in amyotrophic lateral sclerosis: a population based study. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, *79*(1), 33–7. doi:10.1136/jnnp.2007.118018

Caractérisation des souris CHMP2B^{intron5}, un modèle d'étude du continuum SLA-DFT

La Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA) et la Démence Frontotemporale (DFT) sont deux maladies neurodégénératives formant un continuum clinique, génétique et histopathologique. Des mutations dans le gène CHMP2B sont associées à la fois à des cas de SLA et de DFT. Le but de cette thèse a été de caractériser un nouveau modèle de souris transgéniques basé sur l'expression neuronale de la mutation humaine CHMP2B^{intron5}.

Ces souris présentent une faiblesse musculaire progressive et des défauts de coordination motrice. Les motoneurons présentent des altérations au niveau distal. Les souris transgéniques développent des modifications du comportement alimentaire, un désintérêt social et des stéréotypies, tandis que les fonctions mnésiques sont préservées. Nous avons observé une accumulation d'agrégats protéiques dans les neurones ainsi qu'une astrocytose, reflétant le profil histopathologique des patients.

Ainsi, l'expression neuronale de CHMP2B^{intron5} induit chez les souris des symptômes caractéristiques de la SLA et de la DFT ainsi que l'apparition des marqueurs histopathologiques de ce syndrome. Cette lignée permettra l'étude des mécanismes communs impliqués dans le syndrome SLA-DFT.

Mots clés: SLA, DFT, CHMP2B, motoneurone, comportement.

The neurodegenerative diseases Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) and Frontotemporal Dementia (FTD) form a clinical, genetic and histopathological continuum. Mutations in CHMP2B can cause ALS or DFT. The aim of this study was to characterize a new transgenic mouse model based on the neuronal expression of the human mutation CHMP2B^{intron5}.

The mice develop a progressive muscle weakness and motor coordination defects, associated with a distal alteration of the motoneurons. Moreover, their feeding behavior is altered and they develop social disinterest and stereotypies, while mnemonic functions are spared. We observed protein aggregates in neurons and an astrocytosis, mirroring the histopathological profile of patients.

The neuronal expression of the mutant CHMP2B^{intron5} triggers a motor phenotype associated with dementia symptoms and histopathological hallmarks of ALS and FTD. This transgenic line will allow the study of the common mechanisms implicated in the ALS-FTD syndrome.

Key words: ALS, FTD, CHMP2B, motoneuron, behavior.